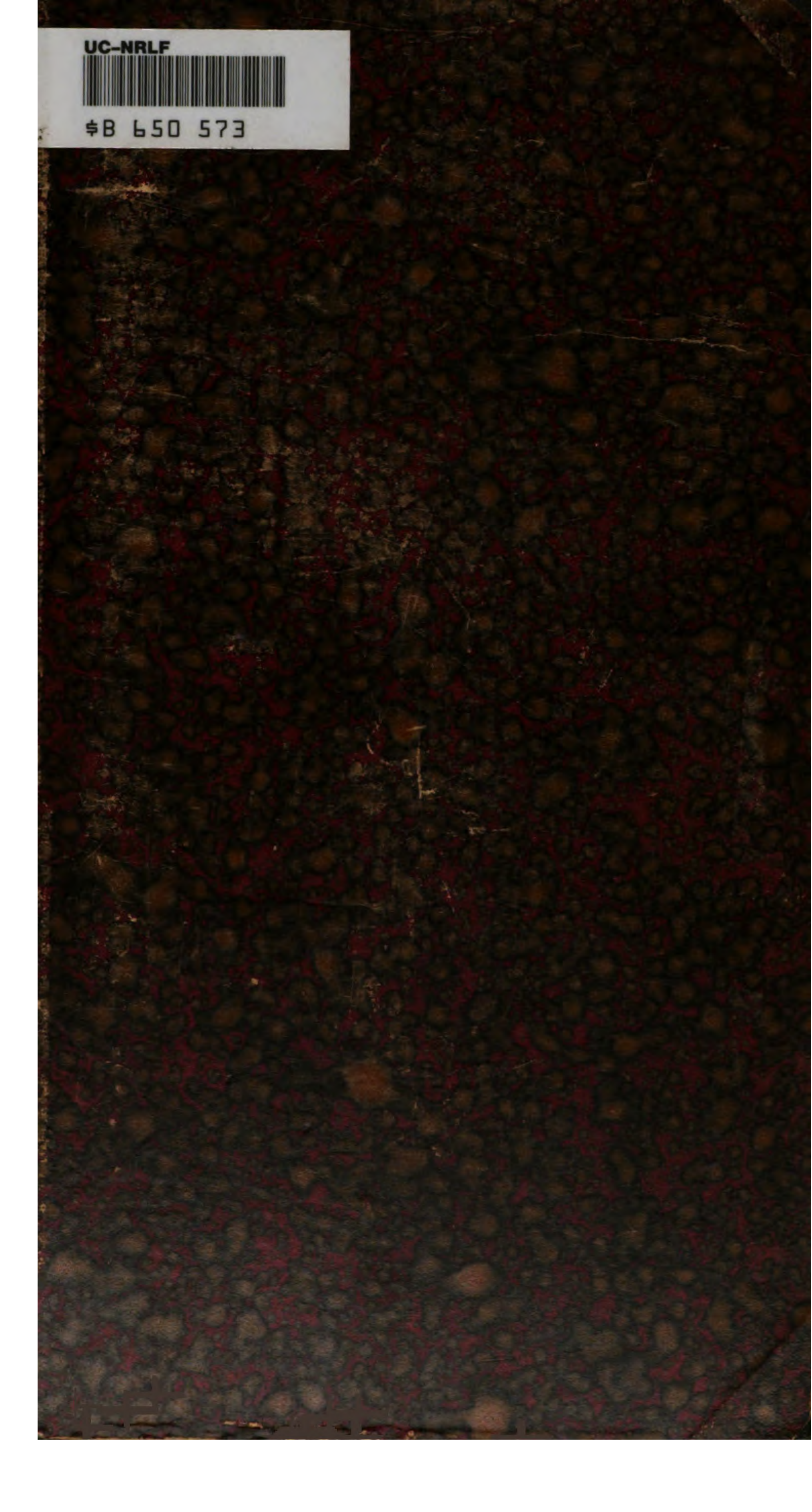
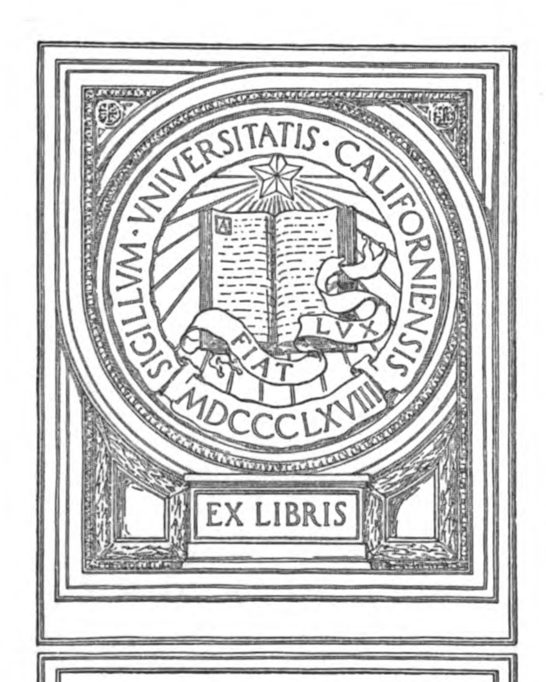



SIGILLVM · VNIVERSITATIS · CALIFORNIENSIS
FIAT LVX
MDCCCLXVIII
EX LIBRIS



Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

E. Buchner-Berlin, P. Ehrlich-Frankfurt a. M., F. Hofmeister-Straßburg i. E., C. von Noorden-Wien, E. Salkowski-Berlin, N. Zuntz-Berlin.

unter Mitwirkung von

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Dreizehnter Band.

Mit 2 Tafeln.



Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1908.

Druck von Oscar Brandstetter, Leipzig.

Inhaltsverzeichnis.

Untersuchungen über den Angriffsort der fluorescierenden Substanzen auf rote Blutkörperchen.

Von

Fr. H. v. Tappeiner.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität in München.)

(Eingegangen am 10. Juli 1908.)

Über die Frage, wo der Angriffsort der sensibilisierenden, fluorescierenden Substanzen auf Zellen gelegen ist, liegen Untersuchungen vor, die von Osthelder-Erhardt[1]) an Paramaecien ausgeführt wurden. Als fluorescierende Körper verwendeten sie Eosin, dichloranthracendisulfonsaures Natron und Methylenblau.

Sie untersuchten in einer ersten Versuchsreihe, ob Paramaecien nach ihrer Trennung von der Farbstofflösung durch Filtrieren und Waschen sich noch sensibilisiert zeigten. Sie fanden hierbei, daß die mit Methylenblau und dichloranthracendisulfonsaurem Natron behandelten Paramaecien auch nach der Auswaschung noch photodynamische Reaktion wahrnehmen ließen, während bei Eosin eine solche mit Sicherheit nicht mehr zu beobachten war. Damit war für die ersteren beiden Stoffe die Aufnahme in die Zelle bewiesen.

Zum gleichen Ergebnis führte eine zweite Versuchsreihe, in der die Paramaecien in Uhrschälchen verschieden lange Zeit im Dunkeln mit einem der genannten drei Körper in Berührung waren und dann gleichzeitig zur Belichtung kamen.

Wenn der Farbstoff ins Innere der Zelle aufgenommen wird, so muß, falls diese Aufnahme eine gewisse Zeit in Anspruch nimmt, die Lichtwirkung am frühesten dort eintreten, wo er am längsten eingewirkt hatte. Es ergab sich in der Tat, daß bei dichloranthracendisulfonsaurem Natron und

---

[1]) Untersuchungen über den Angriffsort der photodynamischen Stoffe bei Paramaecien. Nach Versuchen von F. Osthelder und E. Erhardt, mitgeteilt von H. v. Tappeiner. Diese Zeitschr. 12, 290, 1908.

Methylenblau in nieder konzentrierten Lösungen ($^1/_{20\,000}$ bis $^1/_{1\,000\,000}$ normal) eine deutliche zeitliche Differenz vorhanden war, dagegen nicht bei Eosin. Paramaecien, welche z. B. zwei Stunden in Lösungen genannter Körper verweilt hatten, starben erheblich früher ab als solche, welche nur fünf Minuten der Einwirkung ausgesetzt waren. Dieses Ergebnis läßt sich am einfachsten durch die Annahme erklären, daß die Wirkung des Eosins primär eine Außenwirkung ist und erst sekundär, wahrscheinlich dadurch, daß die Zellplasmahaut photochemisch verändert und durchlässig geworden ist, eine Innenwirkung nach sich zieht, während bei den beiden anderen Stoffen jedenfalls eine Innenwirkung mit im Spiele ist.

Versuche mit konzentrierteren Lösungen bei der zweiten Versuchsreihe ergaben aber weiter, daß auch hier eine Außenwirkung statthat, denn in diesen höheren Konzentrationen starben die Paramaecien in nicht merkbar verschiedener Zeit ab, gleichgültig, ob sie kurz oder länger in ihnen gelegen hatten. Dieses Ergebnis läßt nur die Deutung zu, daß unter diesen Verhältnissen die Außenwirkung mit folgender sekundärer Innenwirkung so prädominiert, daß die Wirkung der vorher beim längeren Aufenthalt im Dunkeln aufgenommenen kleinen Farbstoffmengen ganz zurücktritt.[1])

Diese Paramaecien-Versuche leiden nun aber an einem Übelstand, nämlich dem, daß die Tiere eine Mundöffnung haben und es so ungewiß bleibt, ob die gelösten Stoffe nur durch Osmose oder auch durch die mechanische Tätigkeit des Cystoms (Aufnahme von Flüssigkeitströpfchen analog jener von festen Teilchen) in das Zellinnere gelangten. Infolgedessen war es erforderlich, noch andere Zellarten zu untersuchen.

Als eine zu weiteren Versuchen geeignete Zelle erschien

---

[1]) Um Mißverständnissen vorzubeugen, bemerke ich daß die in dieser Abhandlung gebrauchte Bezeichnung Innenwirkung oder intracelluläre Wirkung nur besagen soll, daß es sich um die photodynamische Wirkung jenes Teiles von fluorescierender Substanz handelt, der an irgendeinem Orte der Zelle (in der Zellmembran oder tiefer) in der Weise festgelegt ist, daß er durch Waschen der Zelle nicht sofort entfernt werden kann, im Gegensatz zur Außenwirkung oder peripheren Wirkung, welche nur dann auftritt, wenn die Zellen in der Farbstofflösung belichtet werden.

das rote Blutkörperchen, von dem Sachs-Saccharow[1]) zeigten, daß es durch fluorescierende Stoffe im Lichte unter Auftreten von Hämolyse ganz analog geschädigt wird, wie es von H. v. Tappeiner und Jodlbauer für andere Zellen gefunden wurde, wobei die Hämolyse ein gutes Maß für die Schädigung darstellt.

Es galt also jetzt, durch Versuche, ähnlich den obenerwähnten, festzustellen, wo bei den roten Blutkörperchen der Angriffsort fluorescierender Substanzen liegt.

Die Versuchsanordnung zur Entscheidung dieser Frage war folgende:

Da die Lichtempfindlichkeit der roten Blutkörperchen nur eine geringe ist, indem sie, auch nach Sensibilisierung, in zerstreutem Tageslicht nicht zum Ausdruck kommt, wurde eine Kohlenbogenlampe benützt von 30 Ampere bei 110 Volt mit einem Magnaliumreflektor, deren Intensität ungefähr Sonnenlicht gleichkam, wie früher gemachte Bestimmungen mit Jodkalium + Eosin als chemischem Photometer gezeigt hatten. Um die sog. Wärmestrahlen möglichst auszuschalten, mußten die Lichtstrahlen zunächst eine Wasserkühlcuvette (von Zeiß, Jena) passieren, in der bei einer Schichtdicke von 10 cm beständig frisches Leitungswasser zirkulierte, dann ein parallelwandiges Glasgefäß, in welchem sich 7%ige, mit Salzsäure angesäuerte Eisensulfatlösung befand in einer Schichtdicke von 15 cm. Eisensulfatlösung absorbiert bekanntlich die infraroten Strahlen noch besser als gewöhnliches Wasser, nämlich bis auf 1,2% der gesamten Strahlung.[2]) Erst in diesem von infraroten und ultravioletten Strahlen nahezu freien Lichtkegel wurden die Proben belichtet, wobei Messungen mit dem Thermometer ergaben, daß die Temperatur des belichteten Blutes 37° C auch bei fünfstündiger Belichtungsdauer nicht überstieg. Die Blutaufschwemmungen kamen in 10 cm langen Reagensgläsern aus Jenenserglas, die vorher zur Ausschließung etwaiger Alkaliwirkung[3]) mit strömendem Wasserdampf behandelt waren, auf einer rotierenden, mit glänzendem weißem Papier belegten Holzscheibe unter rechtwinkliger Incidenz der Strahlen zur Belichtung.

---

[1]) Sachs-Saccharow, Über die hämolytische Wirkung der photodynamischen Stoffe. Münch. med. Wochenschr. 1905, Nr. 7.

[2]) R. Zsigmondy, Wiedemanns Ann. 49, 533.

[3]) Ostwald-Luther, Physiko-chemische Messungen.

Diese Anordnung wurde deshalb getroffen, damit alle Röhrchen unter gleichen Lichtverhältnissen zu stehen kamen und außerdem ein fortwährendes Umschütteln stattfand. Auf diese Weise wurde größte Lichtwirkung bei geringster Wärmewirkung erzielt.

Das zur Verwendung kommende Blut war Rinderblut und wurde jeden Tag frisch in bereits defibriniertem Zustand aus dem Schlachthause bezogen. Dieses Blut wurde dann so verdünnt, daß 25 ccm mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9%) auf 500 aufgefüllt wurden. Von dieser Blutkörperchenaufschwemmung wurden dann die roten Blutkörperchen durch eine elektrisch betriebene Zentrifuge (1400 Umdrehungen in der Minute) in Gläsern von je 100 ccm Inhalt abzentrifugiert und mit 0,9% Kochsalzlösung viermal gewaschen. Eine viermalige Waschung genügte völlig, da mit keiner Eiweißprobe mehr im letzten Spülwasser Eiweiß nachgewiesen werden konnte. Es ist dies wichtig wegen der von G. Busck[1]) gefundenen Hemmung der photodynamischen Wirkung durch zugesetzte Eiweißstoffe.

Die so gewonnenen Blutkörperchen wurden dann noch mit der fünffachen Menge 0,9% Kochsalzlösung verdünnt, so daß eine Konzentration entstand, in der die roten Blutkörperchen von 1 ccm frischen Rinderblutes in 100 ccm 0,9% Kochsalzlösung aufgeschwemmt waren = 1%. Von dieser Blutkörperchenaufschwemmung wurden dann immer 5 ccm mit 5 ccm Farbstofflösung in 0,9% Kochsalzlösung gemischt und belichtet.

Um den Beginn der eintretenden Hämolyse sicher erkennen zu können, wurde der von Gros[2]) angegebene Apparat benützt. Vor einer kleinen Glühbirne befindet sich im Abstand von ungefähr $1^1/_2$ m ein größerer Schirm aus Karton, in den eine Sammellinse eingesetzt ist. Der Schirm dient zum Abhalten aller seitlichen Strahlen. Die Linse entwirft von der Glühlampe ein verkleinertes umgekehrtes Bild in geringem Abstand von dem Schirm. Bringt man die Reagensgläser vor den Schirm, so erkennt man den Beginn der Hämolyse daran, daß der Kohlenfaden der Lampe sichtbar wird, während vorher höchstens ein heller Lichtkreis vorhanden war. Bei einiger Übung ist

[1]) G. Busck, Diese Zeitschr. 1, 425, 1906.

[2]) Gros, Über das Auftreten der Lackfarbe des Blutes in Blutkörperchensuspensionen unter dem Einfluß der Wärme. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 57, Heft 1 u. 2.

jedoch auch ohne weitere Einrichtungen der Beginn der Hämolyse leicht zu erkennen, wenn man die Röhrchen vor eine Flamme hält.

Ich gehe nun auf die Versuche selbst ein. Sie sind an Körpern ausgeführt, welche im Dunkeln keine bemerkbare Schädigung der roten Blutkörperchen ausüben. Die Belege hierfür werden im Abschnitt D gebracht werden.

A. Untersuchungen über den Einfluß der Konzentration und der Aufenthaltszeit der Blutkörperchen in der Farbstofflösung auf die Hämolyse.

I. Bei welcher Konzentration der fluorescierenden Stoffe werden die roten Blutkörperchen am schnellsten aufgelöst?

Sämtliche zu diesem Zwecke gemachten Versuche sind um ganz sichere Resultate zu gewinnen, öfters wiederholt worden. Der Kürze halber wird immer nur ein Versuchsprotokoll angeführt.

Optimumbestimmung für Eosin (Mol.-Gew. 692).

Tabelle I.

Konzentration[1]) der Blutlösung	Konzentration[1]) der Farbstofflösung	Belichtungsdauer bis zu Beginn der Hämolyse	Belichtungsdauer bis zu Vollendung der Hämolyse
0,5%	$^1/_{200}$ mol.	30′	34′
0,5%	$^1/_{500}$ „	23′	27′
0,5%	$^1/_{1000}$ „	17′	19′
0,5%	$^1/_{2000}$ „	16′	17′
0,5%	$^1/_{10000}$ „	20′	22′
0,5%	$^1/_{40000}$ „	40′	44′

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß bei Eosin nicht die höchste Konzentration die beste Wirkung zur Folge hat, sondern daß das Optimum bei einer Verdünnung von $^1/_{2000}$ mol. liegt. Ganz dasselbe haben Jodlbauer und H. v. Tappeiner gefunden bei ihren Untersuchungen über die Wirkung des Eosins auf Invertin.[2])

---

[1]) Alle Konzentrationen sind so angegeben, wie sie sich nach der Mischung mit der Blutlösung, resp. Farbstofflösung darstellen.

[2]) A. Jodlbauer und H. v. Tappeiner, Über die Abhängigkeit der Wirkung der fluorescierenden Stoffe von ihrer Konzentration. Arch. f. klin. Med. 86, 1906.

In gleicher Weise wurden auch die übrigen Glieder der Fluoresceinreihe von mir untersucht, ebenso die Giftwirkung (d. h. die eventuelle Hämolyse im Dunkeln).

I. Hämolyse im Lichte.

Art des Körpers und Konzentration nach der Mischung mit der 0,5 %igen Blutkörperchenaufschwemmung		Totale Hämolyse bei Belichtung nach Minuten
Fluorescein	1/500	35
"	1/2000	120
"	1/10 000	120
"	1/50 000	235
Tetrajodfluorescein	1/500	45
"	1/2000	31
"	1/10 000	17
"	1/50 000	22
"	1/200 000	37
"	1/500 000	74
Tetrachlortetrabromfluorescein	1/2000	7
"	1/10 000	10
"	1/50 000	14
"	1/200 000	27
"	1/500 000	42
Tetrachlortetrajodfluorescein	1/10 000	5
"	1/50 000	6
"	1/200 000	9
"	1/500 000	13

II. Hämolyse im Dunkeln.

Art des Körpers und Konzentration (1 %ige Blutkörperchenaufschwemmung)		Ergebnis
Fluorescein	1/500	Keine Hämolyse nach 24 Stunden
Tetrabromfluorescein	1/500	" " " 24 "
Tetrajodfluorescein	1/10 000	" " " 24 "
Tetrachlortetrabromfluorescein	1/10 000	Totale Hämolyse nach 2 Minuten
"	1/20 000	" " " 3 Stunden
"	1/50 000	" " " 24 "
Tetrachlortetrajodfluorescein	1/10 000	" " " 1 Minute
"	1/20 000	" " " 8 Minuten
"	1/50 000	" " " 1 Stunde

Unter Berücksichtigung der von einigen Körpern schon im Dunkeln bewirkten Hämolyse ergibt sich, daß die Sensibilisierung zunimmt mit fallender Fluorescenz in der Reihenfolge: Fluorescein; Tetrabromfluorescein (Eosin), Tetrachlortetrabromfluorescein (Phloxin), Tetrajodfluorescein (Erythrosin), Tetrachlortetrajodfluorescein

(Rose bengale). Die gleiche Regel wurde bekanntlich von H. v. Tappeiner und Jodlbauer bei der Wirkung auf Paramaecien gefunden, wenn die relative Lichtwirkung, nicht die Bruttowirkung ohne Berücksichtigung der Dunkelwirkung (Giftigkeit) verglichen wurde.

Optimumbestimmung für Methylenblau.

Tabelle II.

Konzentration der Blutlösung	Konzentration der Farbstofflösung	Belichtungsdauer bis zu Beginn der Hämolyse	Belichtungsdauer bis zu Vollendung der Hämolyse
0,5%	$^1/_{500}$ mol.	nach 150′ keine Hämolyse	
0,5%	$^1/_{2000}$ „	80′	88′
0,5%	$^1/_{10000}$ „	60′	64′
0,5%	$^1/_{50000}$ „	50′	52′
0,5%	$^1/_{250000}$ „	53′	56′
0,5%	$^1/_{1000000}$ „	85′	93′
0,5%	$^1/_{2000000}$ „	110′	120′
0,5%	ohne Farbstoff	nach 150′ keine Hämolyse	

Auch beim Methylenblau bedingt also nicht die höchste Konzentration die beste Wirkung, sondern das Optimum liegt hier bei einer Verdünnung unter $^1/_{10000}$, wahrscheinlich in der Nähe von $^1/_{50000}$ mol. Die Erklärung hierfür ist wohl in dem Umstande zu suchen, daß dieser Farbstoff ein sehr hohes Absorptionsvermögen besitzt, bei Verwendung der konzentrierteren Lösungen daher keine wirksamen Strahlen in die zentraleren Teile der Reagensgläser gelangen konnten. Für diese Erklärung spricht insbesondere der in Abschnitt B, V angeführte Versuch mit Phenosafranin.

Optimumbestimmung für dichloranthracendisulfonsaures Natron (Mol.-Gew. 451).

Tabelle III.

Konzentration der Blutlösung	Konzentration der fluorescierenden Stoffe	Belichtungsdauer bis zu Eintritt der Hämolyse	Belichtungsdauer bis zu Vollendung der Hämolyse
0,5%	$^1/_{200}$ mol.	35′	40′
0,5%	$^1/_{2000}$ „	80′	90′
0,5%	$^1/_{20000}$ „	205′	217′
0,5%	$^1/_{100000}$ „	nach 240′ keine Hämolyse	
0,5%	ohne Farbstoff	„ 240′ „ „	

Aus dieser Tabelle ist zu ersehen, daß die höchste Konzentration die beste Wirkung äußert und mit abnehmender

Konzentration eine rasche Abnahme der Wirkung eintritt. Ganz analog sind die Resultate, die Jodlbauer und H. v. Tappeiner[1]) bei ihren Bestimmungen an Invertin und Jodkalium für diesen Körper bekamen.

II. Tritt Hämolyse schneller ein, wenn die roten Blutkörperchen vor der Belichtung längere Zeit in den Farbstofflösungen gelegen haben?

Versuch mit Eosin.

Viermal gewaschene rote Blutkörperchen wurden mit Eosinlösung $^1/_{1000}$ mol. 5^h, bzw. 3^h, 2^h und 0^h vor dem Belichten gemischt und dann gleichzeitig belichtet.

Tabelle IV.

Konzentration der Blutlösung	Konzentration der Farbstofflösung	Zeit, die die Blutkörperchen mit der Farbstofflösung in Berührung waren	Belichtungsdauer bis zur Hämolyse
0,5%	$^1/_{2000}$ mol.	5^h	15′
0,5%	$^1/_{2000}$ „	3^h	15′
0,5%	$^1/_{2000}$ „	2^h	$15^1/_2$′
0,5%	$^1/_{2000}$ „	0^h	$16^1/_2$′

Versuch mit dichloranthracendisulfonsaurem Natron.

Viermal gewaschene rote Blutkörperchen werden mit der Lösung des Anthracenkörpers in einer Konzentration $^1/_{500}$ mol. ca. 5, bzw. 3, 2 und 0 Stunden vor dem Belichten versetzt und dann gleichzeitig belichtet.

Tabelle V.

Konzentration der Blutlösung	Konzentration des fluoresc. Körpers	Zeit, die die Blutkörperchen mit der Farbstofflösung in Berührung waren	Belichtungsdauer bis zur Hämolyse
0,5%	$^1/_{1000}$ mol.	5^h	85′
0,5%	$^1/_{1000}$ „	3^h	86′
0,5%	$^1/_{1000}$ „	2^h	90′
0,5%	$^1/_{1000}$ „	0^h	95′

---

[1]) A. Jodlbauer und H. v. Tappeiner, Über die Abhängigkeit der Wirkung fluorescierender Stoffe von ihrer Konzentration. A. a. O.

Diese beiden Tabellen zeigen, daß das längere Verweilen der Blutkörperchen in der Farbstofflösung im Dunkeln den Eintritt der Hämolyse bei der Belichtung nur in sehr geringem Maße befördert.

B. Untersuchungen über den Angriffsort.

Es wurden folgende zwei Versuchsanordnungen durchgeführt:

Die auf die beschriebene Weise gewaschenen roten Blutkörperchen wurden einmal mit der gleichen Menge Farbstofflösung versetzt und verschieden lange Zeit im Dunkeln unter öfterem Umschütteln stehen gelassen und das andere Mal, versetzt mit verschieden konzentrierter Farbstofflösung, eine gleich lange Zeit.

Danach wurden die roten Blutkörperchen abzentrifugiert und so lange mit 0,9 %iger Kochsalzlösung gewaschen, bis im letzten Spülwasser, mit Linse im künstlichen Licht untersucht, keine Fluorescenz mehr zu sehen war. Dies war gewöhnlich nach sechsmaligem Zentrifugieren und Waschen erreicht. Dann wurden die roten Blutkörperchen, in Kochsalzlösung aufgeschwemmt, belichtet. Einige Versuchsprotokolle sollen angeführt werden.

I. Versuch mit Eosin bei gleicher Konzentration und verschiedener Zeit.

a) Viermal gewaschene Blutkörperchen werden mit Eosinlösung $^{1}/_{1000}$ mol. in 0,9 %iger Kochsalzlösung zu gleichen Teilen versetzt, und zwar zu verschiedenen Zeiten: 5, 3, 1 und 0 Stunden vor dem Zentrifugieren. Dann werden alle Proben zu gleicher Zeit zentrifugiert und sechsmal gewaschen. Im letzten Spülwasser war kein Eosin mehr nachweisbar. Zu diesen Proben kommt bei der Belichtung noch eine Blutkörperchenaufschwemmung mit Kochsalzlösung āā und eine mit Eosin $^{1}/_{1000}$ mol. versetzte.

Das Belichtungsergebnis ist folgendes:

Tabelle VI.

Konzentration des Eosins vor dem Abzentrifugieren	Zeit, die die roten Blutkörperchen mit dem Eosin in Berührung waren	Belichtungsdauer bis zum Eintritt der Hämolyse
$^1/_{2000}$ mol.	5^h	21′
$^1/_{2000}$ "	3^h	$21\frac{1}{2}$′
$^1/_{2000}$ "	1^h	$22\frac{1}{2}$′
$^1/_{2000}$ "	0^h	22′
$^1/_{2000}$ "	Blut ohne Eosin	keine Hämolyse
$^1/_{2000}$ "	" mit "	13′

b) Wiederholung dieses Versuches bei einer Eosinkonzentration $^1/_{10000}$. Die Proben blieben 4, resp. 2, 1 und 0 Stunden vor dem Zentrifugieren im Dunkeln stehen. Dann wurde abzentrifugiert und sechsmal gewaschen.

Belichtungsergebnis:

Tabelle VII.

Konzentration des Eosins vor dem Abzentrifugieren	Zeit, die die roten Blutkörperchen im Dunkeln mit dem Eosin zusammen waren	Belichtungsdauer bis zum Eintritt der Hämolyse	Belichtungsdauer bis zum Vollendung der Hämolyse
$^1/_{20000}$ mol.	4^h	145′	154′
$^1/_{20000}$ "	2^h	160′	174′
$^1/_{20000}$ "	1^h	165′	180′
$^1/_{20000}$ "	0^h	160′	175′

Ergebnis:

Die Dauer des Aufenthaltes der Blutkörperchen in der Eosinlösung hatte bei Konzentration $^1/_{2000}$ keinen deutlichen Einfluß auf den Eintritt der Hämolyse, bei Konzentration $^1/_{20000}$ nur einen geringen und inkonstanten im Sinne einer Förderung.

II. Versuch mit Eosin bei verschiedener Konzentration und gleicher Zeit.

Viermal gewaschene Blutkörperchen (1%ig) werden zu gleichen Teilen versetzt mit einer Eosinlösung $^1/_{100}$ norm., bzw. $^1/_{250}$, $^1/_{1000}$, $^1/_{25000}$. Nachdem die Mischungen 10 Minuten im Dunkeln gestanden haben, wird abzentrifugiert und sechsmal gewaschen. Dazu eine Probe Blutkörperchen ohne Eosin.

Tabelle VIII.

Konzentration des Eosins vor dem Zentrifugieren	Belichtungsdauer bis zum Eintritt der Hämolyse
$^1/_{200}$ mol.	15′
$^1/_{500}$ „	25′
$^1/_{2000}$ „	1^h
$^1/_{10000}$ „	$1^1/_2{}^h$
$^1/_{50000}$ „	keine Hämolyse nach $2^1/_2{}^h$
ohne Eosin	„ „ „ $2^1/_2{}^h$

Wie dieser Versuch zeigt, ist die Konzentration von großem Einfluß auf den Eintritt der Hämolyse, so zwar, daß die höchste Konzentration den größten Einfluß hat. Das Optimum ist hier also ein anderes wie in Versuch A, I bei Belichtung der Blutkörperchen in der Farbstofflösung.

III. Versuch mit dichloranthracendisulfonsaurem Natron bei verschiedener Zeit und gleicher Konzentration.

Viermal gewaschene Blutkörperchen werden mit dichloranthracendisulfonsaurer Natronlösung $^1/_{500}$ mol. āā versetzt, und zwar zu verschiedenen Zeiten 5, 3, 1 und 0 Stunden vor dem Zentrifugieren. Dann werden alle Proben zu gleicher Zeit zentrifugiert und sechsmal gewaschen.

Das Belichtungsergebnis ist:

Tabelle IX.

Konzentration des Farbstoffs vor dem Abzentrifugieren	Zeit, die die Blutkörperchen mit der Lösung im Dunkeln zusammen waren	Belichtungsdauer bis zu Eintritt der Hämolyse	Belichtungsdauer bis zu Vollendung der Hämolyse
$^1/_{1000}$ mol.	5^h	187′	191′
„	3^h	188′	194′
„	1^h	190′	190′
„	0^h	196′	196′

Die Zeit, welche die Blutkörperchen mit dem Anthracenkörper zusammen sind, ist somit nur von geringem förderndem Einfluß auf den Eintritt der Hämolyse.

IV. Versuch mit dichloranthracendisulfonsaurem Natron bei verschiedener Konzentration und gleicher Zeit.

Viermal gewaschene rote Blutkörperchen (1 %ig) werden der Reihe nach āā versetzt mit $^1/_{100}$, $^1/_{250}$, $^1/_{1000}$ und $^1/_{5000}$

norm. dichloranthracendisulfonsaurer Natronlösung, dann zwei Stunden im Dunkeln stehen gelassen, sechsmal abzentrifugiert und belichtet.

Tabelle X.

Konzentration der Anthracen-Lösung vor dem Zentrifugieren	Belichtungsdauer bis zu Eintritt der Hämolyse	Belichtungsdauer bis zu Vollendung der Hämolyse
$^1/_{200}$ mol.	114′	129′
$^1/_{500}$ „	186′	192′
$^1/_{2000}$ „	194′	199′
$^1/_{10000}$ „	199′	204′
ohne	keine Hämolyse nach 240′	

Diese Tabelle lehrt, daß Hämolyse um so schneller eintritt, je konzentrierter die einwirkende Farbstofflösung war.

Die Resultate dieser Versuchsreihen, kurz zusammengefaßt, sind also:

1. Eosin und dichloranthracendisulfonsaures Natron treten in die roten Blutkörperchen ein, und zwar in wirksamer Form, denn bei nachfolgender Belichtung der abzentrifugierten Blutkörperchen tritt Hämolyse ein.

2. Es macht keinen wesentlichen Unterschied aus, ob die Blutkörperchen vor dem Zentrifugieren lang oder kurz mit den fluorescierenden Körpern in Berührung waren, sie gehen bei folgender Belichtung alle nahezu gleich schnell zugrunde. Das Maximum der Farbstoffaufnahme wird also sehr schnell erreicht.

3. Das Maximum wächst mit der Konzentration; die Blutkörperchen gehen schneller zugrunde, wenn die Lösung, in der sie lagen, konzentrierter war.

4. Die Hämolyse tritt erheblich rascher ein, wenn die Blutkörperchen mit der Farbstofflösung belichtet werden, als wenn sie von derselben vorher befreit wurden.

V. Versuche mit Methylenblau und Phenosafraninchlorid.

Viermal gewaschene Blutkörperchen werden mit Methylenblaulösung $^1/_{2000}$ mol zu gleichen Teilen versetzt und 4 resp. 2 und 0 Stunden im Dunkeln stehen gelassen, dann abzentrifugiert, sechsmal gewaschen und belichtet.

Zeit, die die Blutkörperchen vor dem Zentrifugieren in der Farbstofflösung waren	Konzentration des Blutes	Konzentration der Farbstofflösung	Eintritt der Hämolyse
4^h	0,5%	$^1/_{4000}$ mol.	nach 3^h keine Hämolyse
2^h	0,5%	$^1/_{4000}$ "	" 3^h " "
1^h	0,5%	$^1/_{4000}$ "	" 3^h " "
0^h	0,5%	$^1/_{4000}$ "	" 3^h " "

Es trat also keine Hämolyse ein trotz mehrstündiger Belichtung.

Das gleiche war der Fall bei einem anderen Versuch mit verschiedener Konzentration des Methylenblaues bei gleicher Zeit. Diese negativen Ergebnisse erklären sich wahrscheinlich dadurch, daß das Methylenblau wohl in die Blutkörperchen eintrat, aber sofort zu Leukokörper reduziert und somit unwirksam wurde.

Bessere Resultate ergaben die Versuche mit Phenosafranin, welche nachträglich von Harzbecker und Jodlbauer nach gleichen Methoden ausgeführt wurden. Das Phenosafranin ist im Dunkeln ohne Einwirkung, im Lichte hingegen führt es Hämolyse herbei, sowohl wenn die Blutkörperchen in seiner Lösung belichtet werden, als auch wenn die Farbstofflösung vorher abzentrifugiert worden war. Die Ergebnisse sind in folgenden, der Dissertation von Harzbecker[1]) entnommenen Tabellen enthalten.

I. Versuch.

Phenosafranin außerhalb und innerhalb der Zellen, d. h. Phenosafraninlösung nicht abzentrifugiert.

Konzentration der Farbstofflösung	Eintritt der Hämolyse nach
$^1/_{2000}$	90 Minuten
$^1/_{5000}$	70 "
$^1/_{20000}$	60 "
$^1/_{100000}$	95 "
$^1/_{500000}$	110 "
$^1/_{2000000}$	125 "

II. Versuch.

Phenosafranin innerhalb der Zellen, d. h. Phenosafraninlösung vor der Belichtung abzentrifugiert und durch Kochsalzlösung ersetzt;

[1]) O. Harzbecker, Inaug.-Dissert., München 1908.

Konzentration	Eintritt der Hämolyse nach
$^1/_{200}$	75 Minuten
$^1/_{500}$	55 „
$^1/_{2000}$	40 „
$^1/_{5000}$	65 „
$^1/_{20\,000}$	80 „
$^1/_{100\,000}$	115 „

Ergebnis:

1. Bei Belichtung der Blutkörperchen in der Safraninlösung ist das Optimum der Wirkung ähnlich wie bei Methylenblau erst bei großer Verdünnung ($^1/_{20\,000}$ mol.) erreicht, bei Belichtung der von der Safraninlösung durch Waschen getrennten Blutkörperchen hingegen ist es bei $^1/_{2000}$ gelegen, auch tritt in diesem Falle die Hämolyse früher ein (40 Minuten gegen 60 Minuten im ersteren Falle). Diese Differenz erklärt sich wohl aus dem Umstande, daß von dem in der Außenlösung befindlichen Phenosafranin sehr viel wirksame Strahlen absorbiert werden, ehe das Licht zu den Blutkörperchen tritt, wogegen im zweiten Falle, wo der Farbstoff innerhalb der Zellen ist, sämtliches Licht an die Blutkörperchen gelangt.

2. Die für Phenosafranin an gewaschenen Blutkörperchen gefundene optimale Konzentration ist dieselbe, wie sie von Jodlbauer und H. v. Tappeiner bei der Lichtwirkung für die Körper der Fluoresceinreihe und des Methylenblaus auf Invertin sowie von mir für die in Eosinlösung belichteten Blutkörperchen gefunden wurde. Wogegen ich an den gewaschenen Blutkörperchen für Eosin fand, daß die höchste Konzentration dieses Farbstoffes den höchsten Effekt besaß. Es spricht dies für besondere Bindungsverhältnisse des Eosins in den Blutkörperchen, wie im Abschnitt C noch besprochen werden soll.

C. Bestimmung der Menge der in die roten Blutkörperchen eingetretenen Farbstoffe auf colorimetrischem Wege.

Bei allen beschriebenen Versuchen wurden immer Kontrollproben der gewaschenen Blutkörperchen, nachdem sie mit Eosin oder dichloranthracendisulfonsaurem Natron längere oder kürzere Zeit im Dunkeln gestanden, sodann abzentrifugiert und gewaschen waren, noch längere Zeit beobachtet, um zu sehen, ob der

aufgenommene Farbstoff nicht etwa auch ohne Belichtung hämolytisch wirke. Es zeigte sich keine Hämolyse, wohl aber ein Austritt des fluorescierenden Körpers, der namentlich bei Eosin viel stärker war, als er nach dem Sensibilisierungsgrad der abzentrifugierten Blutkörperchen zu vermuten war, und die Aussicht eröffnete, die eingetretene Farbstoffmenge außer durch die photodynamische Reaktion auch noch auf einem anderen Wege zu bestimmen, nämlich durch direkte Messung auf optischem Wege. Es wurde folgendermaßen vorgegangen:

25 ccm der viermal gewaschenen einprozentigen Blutkörperchenaufschwemmung wurden āā versetzt mit Farbstofflösung und verschieden lange Zeit im Dunkeln stehen gelassen. Danach wurden sie abzentrifugiert und sechsmal gewaschen. Mit Kochsalzlösung auf genau 50 ccm aufgefüllt, blieben sie dann zwölf Stunden im Eisschrank stehen. In die überstehende Flüssigkeit ist zu dieser Zeit der Farbstoff wieder ausgetreten, denn ließ man die abermals abzentrifugierten Blutkörperchen nochmals zwölf Stunden stehen, so war kein Farbstoff in der Flüssigkeit mehr nachzuweisen. In der überstehenden Flüssigkeit wurde sodann ermittelt, wieviel ihr Kochsalzlösung zugefügt werden mußte, bis der mit Sammellinse durch eine konstante Lichtquelle (Sonne) entworfene Fluorescenzkegel oder ein bestimmter Absorptionsstreifen im Spektrum verschwand. Bei Eosin kamen beide Methoden zur Verwendung. Sein Absorptionsstreifen verschwindet, in Schichtendicke von 2,8 cm untersucht, bei Verdünnung auf $^1/_{650\,000}$ mol. Der Fluorescenzkegel war für mein Auge nicht mehr wahrnehmbar bei Verdünnung auf $^1/_{150\,000\,000}$. Die Konzentration von Dichloranthracendisulfonat wurden mittels Fluorescenz bestimmt; dieselbe verschwand bei Verdünnung auf $^1/_{10\,000\,000}$ mol. Die Absorption in der Phenosafraninlösung verschwand bei Verdünnung auf $^1/_{800\,000}$ mol bei 2,8 cm Schichtendicke und Verwendung von gewöhnlichem Tageslicht.

Aus diesen Verdünnungszahlen und den von mir mit den Hämokriten von Hedin[1]) gefundenen Volum der Blutkörperchen des Rindes in der $5\,^0/_0$igen Aufschwemmung zu $2{,}0\,^0/_0$ konnte sodann die Konzentration der Farbstoffe in den Blut-

[1]) Pflügers Archiv 60, 360.

körperchen berechnet werden. Durch Zählen in der Thomas Zeißschen Zählkammer wurde außerdem auch noch die Zahl der roten Blutkörperchen in 50 ccm der 1 % igen Aufschwemmung festgestellt. Sie betrug $2412^1/_2$ Millionen.

Bestimmung für Eosin.

a) 25 ccm einer 1 % igen Blutkörperchenlösung wurden der Reihe nach zu gleichen Teilen versetzt mit $^1/_{4000}$ norm. Eosin und 4 resp. 2 und 0 Stunden im Dunkeln gelassen. Nach dieser Zeit wurden die drei Proben gleichzeitig durch Abzentrifugieren und sechsmaliges Waschen vom Eosin befreit. Im letzten Spülwasser war kein Fluorescenzkegel mehr zu erkennen. Die drei Proben kamen dann in den Eisschrank und blieben hier 12 Stunden stehen. Nach dieser Zeit ist das Eosin aus den Blutkörperchen in die Kochsalzlösung ausgetreten, und zwar war seine Konzentration in allen Proben dieselbe, nämlich $^1/_{100\,000}$ mol oder $^1/_{203}$ mol auf das Volum der Blutkörperchen berechnet.

b) Ein anderer Versuch mit Eosin wurde folgendermaßen angestellt: 25 ccm der 1 % igen Blutaufschwemmung wurden der Reihe nach versetzt mit 25 ccm Eosinlösung $^1/_{100}$, $^1/_{250}$, $^1/_{500}$ und $^1/_{1000}$ mol und 2 Stunden im Dunkeln stehen gelassen; danach sechsmal abzentrifugiert und gewaschen. Die so vorbereiteten Blutkörperchen wurden dann durch Zusatz von destilliertem Wasser aufgelöst. Nach dem Ausäuern wurde alles Eosin mit Chloroform ausgeschüttelt, im Scheidetrichter vom Wasser getrennt und nach Alkalisierung in wässerige Lösung übergeführt, in welcher dann die Bestimmung der Konzentration gemacht wurde.

Auf diese Weise wurde gefunden, daß mit absteigender Konzentration des Eosins auch die Menge des eintretenden Eosins abnimmt.

Konzentration des Eosins vor dem Abzentrifugieren	Konzentration des Blutes	Konzentration des ausgetretenen Eosins in 50 ccm	Daraus berechnete Konzentration in den Blutkörperchen
$^1/_{200}$ mol.	0,5 %	$^1/_{45\,000}$ mol.	$^1/_{91}$ mol.
$^1/_{500}$ „	0,5 %	$^1/_{60\,000}$ „	$^1/_{125}$ „
$^1/_{1000}$ „	0,5 %	$^1/_{70\,000}$ „	$^1/_{162}$ „
$^1/_{2000}$ „	0,5 %	$^1/_{72\,500}$ „	$^1/_{168}$ „

Ergebnis:

1. Die Menge des eintretenden Eosins ist in weiten Grenzen unabhängig von der Zeit, die die roten Blutkörperchen mit dem Eosin in Berührung waren (Versuch 12);

2. Abhängig dagegen von der Konzentration der Außenlösung (Versuch 13). Diese beiden Punkte stimmen mit den Bestimmungen durch die photodynamische Reaktion überein.

3. In den roten Blutkörperchen ist das Eosin in höherer Konzentration versammelt als der Intensität der Sensibilisierung entspricht, ja sogar höher als in der Außenlösung (Versuch 4). Diese sehr merkwürdige Tatsache weist darauf hin, daß das Eosin nicht allein durch Osmose aufgenommen wird, sondern daß eine chemische oder, wie ich für wahrscheinlicher halte, eine adsorptive Bindung an gewisse Blutkörperchenbestandteile stattfindet. Mit dieser Annahme stimmt auch die Beobachtung, daß die Aufnahme in wenigen Minuten nahezu vollendet ist, der Austritt hingegen Stunden in Anspruch nimmt. Adsorptions-Bindungen vollziehen sich bekanntlich meist mit sehr großer Geschwindigkeit.

Bestimmung für dichloranthracendisulfonsaures Natron.

Es wurde derselbe Versuch gemacht, wie oben für Eosin beschrieben wurde. 25 ccm der 1%igen Blutkörperchenaufschwemmung wurden zu gleichen Teilen versetzt mit dichloranthracendisulfonsaurem Natron in den Konzentrationen $^1/_{100}$, $^1/_{250}$, $^1/_{1000}$, $^1/_{5000}$ mol. Nachdem die Mischungen 2 Stunden im Dunkeln gestanden, abzentrifugiert und gewaschen waren, blieben sie über 24 Stunden im Eisschrank stehen. Nach dieser Zeit war das dichloranthracendisulfonsaure Natron ausgetreten. Zur Bestimmung seiner Konzentration wurde mit Kochsalzlösung (0,9%) so lange verdünnt bis der Fluorescenzkegel — mittels Linse in der Sonne erzeugt — verschwand. Dies war der Fall bei $^1/_{10\,000\,000}$ mol. Ohne Linse erkennt man die Fluorescenz nur bis zu einer Konzentration $^1/_{1\,000\,000}$ mol. Ich erhielt folgendes Resultat:

Konzentration des Anthracens vor dem Zentrifugieren	Konzentration des Blutes	Konzentration des ausgetretenen Anthracens in 50 ccm	Konzentration umgerechnet auf das Volumen der roten Blutkörperchen
$^1/_{200}$ mol.	0,5%	$^1/_{3500000}$ mol.	$^1/_{7113}$ mol.
$^1/_{500}$ „	0,5%	$^1/_{4000000}$ „	$^1/_{8130}$ „
$^1/_{2000}$ „	0,5%	$^1/_{4000000}$ „	$^1/_{8130}$ „
$^1/_{10000}$ „	0,5%	$^1/_{4000000}$ „	$^1/_{8130}$ „

Ergebnis:

Die Konzentration, in der dieser Körper in den roten Blutkörperchen enthalten ist, ist beträchtlich geringer als die Konzentration in der Außenlösung und scheint von letzterer in weiten Grenzen nahezu unabhängig zu sein.

Bestimmung für Phenosafraninchlorid.

Dieselbe leidet an dem Übelstande, daß es auch nach zehnmaligem Zentrifugieren und Waschen der Blutkörperchen mit Kochsalzlösung nicht gelang, eine von Farbstoff vollständig freie Außenlösung zu erhalten, während bei den vorher untersuchten Körpern ein fünfmaliges Zentrifugieren genügte. Es dürfte dies dem Umstande zuzuschreiben sein, daß der Austritt des Phenosafranins in die farbstofffreie Außenlösung sehr rasch erfolgt. Die in folgender Tabelle angegebenen Werte sind daher nur als erste Annäherungen an den wirklichen Gehalt zu betrachten.

Konzentration des Phenosafranins in der Außenlösung	Konzentration des Phenosafranins in den Blutkörperchen, nachdem sie von der Farbstoffaußenlösung durch Zentrifugieren getrennt, zwei Stunden in Kochsalzlösung gestanden hatten
$^1/_{200}$	$^1/_{714}$
$^1/_{500}$	$^1/_{1333}$
$^1/_{2000}$	$^1/_{2000}$

Ergebnis:

Phenosafranin tritt in ansehnlicher Menge in die Blutkörperchen ein. Die erreichte Konzentration bleibt jedoch im allgemeinen unter jener der Außenlösung, wenigstens gilt dies für die konzentrierten Außenlösungen.

D. Untersuchungen über die Dunkelwirkung der verwendeten fluorescierenden Stoffe.

Die roten Blutkörperchen zeigen, wenn man sie mit den von mir benützten Farbstofflösungen zusammenbringt und im Dunkeln stehen läßt, keine Hämolyse. Damit ist aber das Stattfinden einer gewissen Schädigung, die erst manifest wird, wenn die größere Schädigung durch das Licht hinzutritt, nicht ausgeschlossen. Um zu entscheiden, ob eine solche Dunkelwirkung geringen Grades vorhanden ist, wurde die eventuelle Wirkung der fluorescierenden Substanzen im Dunkeln mit jener eines anderen stark schädigenden Agens, der Wärme, kombiniert.

Normale rote Blutkörperchen gehen bei einer bestimmten Temperatur in einer bestimmten Zeit zugrunde.[1]) Haben die Blutkörperchen aber vorher schon eine Schädigung durch irgend etwas, z. B. Spuren von Säuren oder Alkali, die für sich allein noch keine Hämolyse zu bewirken vermöchte, erfahren oder kommt eine solche zu der Wärmewirkung noch hinzu, so tritt die Hämolyse früher ein.

Die Versuchsanordnung war folgende: In einem Thermostaten stand eine große mit Wasser gefüllte Glaswanne, in der in einem Rahmen nach allen Seiten verschieblich eine Glühlampe angebracht war. Auf der Wanne lag in einem ungefähren Abstand von 20 cm von der Lampe eine horizontale durchbohrte Platte, in die die Reagensgläser gesteckt werden konnten. Die Lampe konnte so bequem hinter jedes einzelne Gläschen geschoben werden, ohne daß man es aus dem Wasser nehmen mußte. Außerdem hatte die Anordnung den Vorteil, daß die Wanne nicht direkt, sondern indirekt geheizt wurde, wobei Temperaturschwankungen im Wasser leichter auszuschließen waren, wie auch ein Kontrollthermometer, das konstante Temperatur zeigte, bewies. Der Beginn der Hämolyse konnte bei dieser Einrichtung auf das genaueste erkannt werden. Bei dieser Gelegenheit wurde auch untersucht, ob es von Einfluß auf den Eintritt der Hämolyse ist, wenn die Blutkörperchenaufschwemmung mit Kohlensäure gesättigt war. Es wurde in

---

[1]) Gros, Über das Auftreten der Lackfarbe des Blutes in Blutkörperchensuspensionen unter dem Einfluß der Wärme. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 57, Heft 1 u. 2.

die 1 $^0/_0$ ige Blutkörperchenaufschwemmung während 10 Minuten Kohlensäure eingeleitet und bei mehreren der nachfolgenden Versuche Parallelversuche mit kohlensäurereichem und kohlensäurearmem Blut gemacht. Es ergab sich dabei, daß der Gehalt der Aufschwemmung an Kohlensäure von keinem merkbaren Einfluß auf den Eintritt der Hämolyse ist.

1. Versuch mit Eosin.

Viermal gewaschene rote Blutkörperchen wurden der Reihe nach zu gleichen Teilen versetzt mit Eosinlösung in den Konzentrationen $^1/_{100}$, $^1/_{250}$, $^1/_{1000}$, $^1/_{5000}$ und blieben in diesen Mischungen 2 Stunden im Dunkeln stehen. Nach dieser Zeit wurden sie in je zwei Hälften geteilt, wovon die eine mit Eosinlösung in der entsprechenden Konzentration aufs fünffache verdünnt wurde. Die andere dagegen wurde abzentrifugiert, fünfmal gewaschen und dann ebenfalls aufs fünffache mit 0,9 $^0/_0$ iger Kochsalzlösung verdünnt. Die Verdünnung geschah, um den Beginn der Hämolyse besser verfolgen zu können, der bei konzentrierteren Blutkörperchensuspensionen durch eintretende Gerinnung verdeckt wird.

Die so vorbereiteten Lösungen kamen dann in den Termostaten.

I. Blutkörperchen in Farbstofflösung.

Temperatur 59° C.

Konzentration der Farbstofflösungen	Konzentration des Blutes	Eintritt der Hämolyse nach
$^1/_{200}$ norm.	0,1 $^0/_0$	$3^1/_2{}'$
$^1/_{500}$ „	0,1 $^0/_0$	5′
$^1/_{2000}$ „	0,1 $^0/_0$	14′
$^1/_{10\,000}$ „	0,1 $^0/_0$	$14^1/_2{}'$
ohne Eosin	0,1 $^0/_0$	15′

II. Blutkörperchen von der Farbstofflösung abzentrifugiert.

Temperatur 59° C.

Konzentration des Eosins vor dem Zentrifugieren	Konzentration des Blutes	Eintritt der Hämolyse nach
$^1/_{200}$ norm.	0,1 $^0/_0$	$15^1/_2{}'$
$^1/_{500}$ „	0,1 $^0/_0$	15′
$^1/_{2000}$ „	0,1 $^0/_0$	$15^1/_2{}'$
$^1/_{10000}$ „	0,1 $^0/_0$	$15^1/_2{}'$
ohne Eosin	0,1 $^0/_0$	15′

2. Versuch mit dichloranthracendisulfonsaurem Natron.

Dieser Versuch wurde ganz ebenso wie der Versuch mit Eosin durchgeführt.

I. Blutkörperchen in der Lösung des Anthracenkörpers.

Temperatur 59° C.

Konzentration des Anthracenkörpers	Konzentration des Blutes	Eintritt der Hämolyse nach
$^1/_{200}$ norm.	0,1%	4′
$^1/_{500}$ „	0,1%	8′
$^1/_{2000}$ „	0,1%	13′
$^1/_{10000}$ „	0,1%	14′
ohne	0,1%	15′

II. Blutkörperchen vom Anthracenkörper abzentrifugiert.

Temperatur 59° C.

Konzentration des Anthracenkörpers vor dem Abzentrifugieren	Konzentration des Blutes	Eintritt der Hämolyse nach
$^1/_{200}$ norm.	0,1%	15′
$^1/_{500}$ „	0,1%	16′
$^1/_{2000}$ „	0,1%	16′
$^1/_{10000}$ „	0,1%	$16^1/_2$′
ohne	0,1%	15′

Man sieht aus diesen vier Tabellen, daß nur dann eine schnellere Auflösung der roten Blutkörperchen durch die Wärme eintritt, wenn sie in der Lösung des Eosins oder Dichloranthracendisulfonats zur Erwärmung kommen; nicht aber, wenn der Farbstoff vorher abzentrifugiert wurde. Die Schädigung nimmt zu mit der Konzentration. Dieser Befund ist nur so zu deuten, daß erst die erwärmte Farbstofflösung deutlich schädigend einwirkt. Dieses Verhalten gilt aber durchaus nicht für alle fluorescierenden Stoffe, denn andere, wie z. B. Phloxin und Rose bengale, üben nach meinen in Abschnitt A aufgeführten Beobachtungen noch in Konzentrationen von $^1/_{10000}$ mol eine derartige Giftwirkung aus, daß die Hämolyse schon bei Zimmertemperatur und im Dunkeln in 1—2 Minuten total ist.

Die Arbeit hat folgende Hauptresultate ergeben:

1. Eosin und dichloranthracendisulfonsaures Natron üben im Dunkeln bei Zimmertemperatur keine bemerkbare Schädi-

gung auf rote Blutkörperchen aus, denn nach Trennung von der Außenlösung findet die Hämolyse durch Erwärmen auf 59° fast genau zu derselben Zeit statt wie bei Blutkörperchensuspensionen ohne vorausgegangene Behandlung mit diesen Stoffen.

2. Mit Eosin und dichloranthracendisulfonsaurem Natron behandelte und dann abgetrennte Blutkörperchen erfahren in relativ kurzer Zeit Hämolyse, wenn sie Lichtstrahlen von einer Stärke ausgesetzt werden, die an sich nach 6 Stunden nicht hämolytisch wirken. Da die genannten Stoffe nach Punkt 1 keine nennenswerte Dunkelwirkung besitzen, ist diese Hämolyse als ein Beweis dafür anzusehen, daß Eosin und dichloranthracendisulfonsaures Natron in einer Form in die roten Blutkörperchen aufgenommen werden, welche noch sensibilisierend wirkt. Über den Ort dieser durch Waschung der Blutkörperchen nicht entfernbaren Ansammlung von Farbstoff, ob im ganzen Blutkörperchen oder nur in den oberflächlichen Schichten, lassen die Versuche ein Urteil nicht zu.

3. Trotz dieser in Punkt 2 konstatierten Innenwirkung ist die beim Belichten der roten Blutkörperchen in den fluorescierenden Lösungen auftretende Hämolyse doch zum Teil zunächst Außenwirkung, d. h. Wirkung von Farbstoff, der nicht an den Blutkörperchen haftet, denn die Hämolyse tritt beim Belichten in der Lösung erheblich rascher ein, als nach ihrer vorherigen Entfernung durch Auswaschung. Vermutlich wird durch diese Außenwirkung eine Veränderung der Oberfläche der roten Blutkörperchen derart hervorgerufen, daß jetzt größere Mengen von Eosin und dichloranthracendisulfonsaurem Natron in wirksamer Form ins Innere gelangen.

4. Der Eintritt der Hämolyse ist in weiten Grenzen unabhängig von der Zeit, in der die Blutkörperchen mit den fluorescierenden Stoffen in Berührung waren, bevor sie abzentrifugiert wurden, gleichgültig, ob die Einwirkung 4 Stunden oder nur wenige Minuten gedauert hat. Dagegen findet bei steigender Konzentration steigende Wirkung statt, weil auch die Konzentration in den Blutkörperchen mit der Außenkonzentration wächst. Und hiermit ist ein großer Unterschied in bezug auf Innen- und Außenwirkung gegeben, wenigstens beim Eosin, indem bei ersterer steigende Konzentration steigende Wirkung

zur Folge hat und bei letzterer das Optimum bei $^1/_{2000}$ erreicht ist.

5. Methylenblau zeigt nur Außenwirkung, weil es wahrscheinlich nach der Aufnahme alsbald in unwirksame Form übergeht, resp. chemisch verändert wird. Das nicht reduzierbare Phenosafranin zeigte sowohl Innen- wie Außenwirkung.

6. Das von den roten Blutkörperchen aufgenommene Eosin, dichloranthracendisulfonsaure Natron und Phenosafranin geht bei längerem Stehen wieder aus den Blutkörperchen heraus. Aus der colorimetrischen Bestimmung der Menge des ausgetretenen Farbstoffes und Bestimmung des Volumens der roten Blutkörperchen konnte die Konzentration berechnet werden, in welcher diese Farbstoffe in den Blutkörperchen enthalten gewesen sein mußten. Hierbei ergab sich beim Eosin die nach den Erfahrungen an Paramaecien[1]) und den eingangs erwähnten Untersuchungen Overtons über die minimale Löslichkeit des Eosins in Cholesterin und Lecithin nicht zu erwartende Tatsache, daß diese Konzentration höher gewesen sein mußte, als der Intensität der photodynamischen Reaktion entsprach, ja sogar höher als die Konzentration der Außenlösung. Ein Teil dieses aufgenommenen Eosins muß in den Blutkörperchen in einer Form gebunden oder adsorbiert enthalten sein, welche eine Sensibilisierung nicht mehr zuläßt.[2])

Am Schlusse meiner Arbeit drängt es mich, Herrn Prof. Jodlbauer für die liebenswürdige und weitgehende Unterstützung herzlich zu danken, die er mir während der ganzen Arbeit in freundlichster Weise zuteil werden ließ.

---

[1]) Osthelder und Erhardt, Diese Zeitschr. 12, 290, 1908.

[2]) Vermutlich sind die Bindungsverhältnisse des Cholesterins und Lecithins in den roten Blutkörperchen eigenartige und sind auch noch andere Lipoide für die Aufnahmsfähigkeit des Eosins von bestimmendem Einfluß. Dafür sprechen auch die negativen Resultate, welche Herr Hannes im hiesigen Institute an Membranen erhielt, welche nach der Methode von Hofmeister-Pascucci mit Cholesterin oder Lecithin imprägniert waren: Dieselben wurden weder bei Bestrahlung für sich durch sichtbares oder ultraviolettes Licht, noch auf Zusatz von Eosinlösung für Hämoglobinlösung durchgängig.

Über die Dunkelwirkung fluorescierender Stoffe auf Eiweiß, Toxine und Fermente und ihre Reversibilität.

Von

T. Kudo und A. Jodlbauer.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität München.)

(Eingegangen am 1. August 1908.)

Bereits in früheren Mitteilungen war die Frage, ob die fluorescierenden Stoffe, denen bekanntlich die gemeinsame Eigenschaft zukommt, die Empfindlichkeit von Zellen, Fermenten, Toxinen usw. gegenüber den sichtbaren Lichtstrahlen zu steigern,[1]) auch im Dunkeln eine, wenn auch sehr geringe Wirkung auf diese Objekte ausüben, mehrmals berührt worden.

So hat W. Straub[2]) angegeben, daß Eosin wie auch Chininsulfat bereits im Dunkeln aus Jodkaliumlösungen Jod abspaltend wirken. Diesen Befund konnte der eine von uns (J.)[3]) bei Verwendung neutraler Lösungen nicht bestätigen, und es drängte sich die Vermutung auf, daß bei Straub eine Säurewirkung mit im Spiele war. Denn selbst Spuren von Säuren ($^1/_{1000}$ mol.) wirken im Dunkeln Jod abspaltend.

Ebenso fielen auch Dunkelversuche mit einem Fermente (Diastase) und einem Toxin (Ricin) bei Verwendung

---

[1]) H. von Tappeiner und A. Jodlbauer, Die sensibilisierende Wirkung fluorescierender Substanzen, Leipzig 1907.

[2]) W. Straub. Chemische Charakteristik der Wirkung belichteter Eosinlösung auf lebende Zellen. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 51, 383.

[3]) A. Jodlbauer, Weitere Untersuchungen, ob eine Dunkelwirkung der fluorescierenden Stoffe statthat? Arch. f. klin. Med. 85, 395 bis 398.

von Eosin und dichloranthracendisulfonsaurem Natrium in Konzentration von $^{1}/_{2000}$ mol. negativ aus.

Dagegen zeigte es sich bei photodynamischen Versuchen mit Diphtherie- und Tetanustoxin[1]), daß die Kontrolltiere, welche im Dunkeln mit Toxin + fluorescierenden Stoffen injiziert und gehalten wurden, länger am Leben blieben als die Tiere, denen das Toxin allein injiziert war.

Ebenso wiesen Flexner und Noguchi[2]) nach, daß Tetanolysin, wenn man es mit Eosin mengte — 2 ccm Lysin und 0,3 ccm einer 1 $^{0}/_{0}$igen Eosinlösung (somit $^{1}/_{500}$ mol. Konzentration im Gemenge) — bei 37 $^{0}/_{0}$ C im Dunkeln gehalten vollständig destruiert wurde. Ähnliches Verhalten zeigte Tetanusspasmin, erhalten aus den Filtraten von Bouillonkulturen. Wurde 1 ccm mit 0,5 ccm 5 $^{0}/_{0}$ Eosin versetzt und 1 Stunde lang bei 37 ^{0} C im Dunkeln stehen gelassen, sodann in die Glutäalgegend weißer Mäuse injiziert, so traten keine Wirkungen mehr auf.

Es soll schon an dieser Stelle gleich hervorgehoben werden, daß die Eosinmengen hierbei viel bedeutender waren als in den anfänglich mitgeteilten Dunkelversuchen mit Diastase und Ricin.

Ferner konnte Busck[3]) in seiner Arbeit über die photobiologischen Sensibilisatoren und ihre Eiweißverbindungen mit Sicherheit den Nachweis erbringen, daß der Zusatz fluorescierender Stoffe zu Serum auch bei völligem Lichtabschluß Veränderungen im Serum, sowie solche der fluorescierenden Substanz selbst hervorruft.

Was die ersteren anlangt, so zeigen sie sich an einem im Serum enthaltenen für Infusorien (Paramaecium caudatum) giftigen Körper (Alexin). Werden zu Serum Paramaecien zu-

---

[1]) A. Jodlbauer und H. von Tappeiner, Über die Wirkung fluorescierender Stoffe auf Toxine. Arch. f. klin. Med. 85, 399.

[2]) Flexner und Noguchi, The effect of eosin upon tetanustoxin and upon tetanus in rats and guineapigs. Journ. of experim. Med. 8, Jan. 1906.

[3]) G. Busck, Die photobiologischen Sensibilisatoren und ihre Eiweißverbindungen. Diese Zeitschr. 1, 425 bis 540, 1906,

gesetzt, so stellen die Tiere schon nach einigen Minuten ihre Bewegungen ein und vereinigen — agglutinieren — sich, mit den hintersten Polen aneinander stoßend. Werden nun dem Serum fluorescierende Stoffe (Tetrabromfluorescein-Natrium, Tetrajodfluorescein-Natrium, Phenosafraninchlorid, Dichloranthracendisulfonsaures Natrium usw.) im Dunkeln zugemischt und dann ebenfalls bei Lichtabschluß Paramaecien zugegeben, so tritt diese spezifische Giftwirkung des Serums auf Paramaecien nicht oder in weitaus geringerem Grade ein.

Die etwas kompliziert liegenden Verhältnisse mögen zwei von uns angestellte Versuche mit Paramaecien beleuchten. Sie enthalten eine volle Bestätigung der Busckschen Angaben.

Versuch I.

(Dichloranthracendisulfonsaures Natrium.)

Im Dunkeln wurden in Uhrschälchen gemengt: 1 ccm dichloranthracendisulfonsaures Natrium in Konzentration von $^1/_{10}$, $^1/_{25}$, $^1/_{50}$ und $^1/_{100}$ mol. + 1 ccm Brunnenwasser, + 1 ccm Rinderserum resp. 1 ccm Brunnenwasser. Sodann wurde 1 ccm Paramaecienkultur zugesetzt. Der Wasserzusatz hat nur die Bedeutung, die für Paramaecien schädliche Salzkonzentration des Serums herabzudrücken. Die gemischten 4 ccm blieben im Dunkelzimmer zur Beobachtung stehen.

Dichloranthracendisulfonsaures Natrium (nach der Mischung)	Rinderserum	Eintritt des Todes (resp. vollständiger Agglutinierung)	Bemerkungen
ohne	mit	nach 24′ agglutiniert	Alexinwirkung
$^1/_{40}$ mol.	ohne	„ 30′ tot	Substanzwirkung
$^1/_{40}$ „	mit	„ 150′ tot	keine Agglutinierung daher Substanzwirkung
$^1/_{100}$ „	ohne	„ 120′ die meisten tot	Substanzwirkung
$^1/_{100}$ „	mit	„ 24h lebend	Alexin- und Substanzwirkung aufgehoben
$^1/_{200}$ „	ohne	„ 24h tot	Substanzwirkung
$^1/_{200}$ „	mit	„ 90′ agglutiniert	Alexinwirkung
$^1/_{400}$ „	ohne	„ 24h lebend	
$^1/_{400}$ „	mit	„ 54′ agglutiniert	Alexinwirkung

Hieraus ist zu ersehen, daß sowohl bei Zusatz von Serum allein wie von dichloranthracendisulfonsaurem Natrium ($^1/_{40}$ mol.) die Tiere sterben, und zwar im ersteren Falle durch das Alexin, im letzteren durch die Giftwirkung des Dichloranthracens. Sind Serum und Dichloranthracen zugleich

vorhanden, so tritt das Absterben weit später ein. Es hat somit eine teilweise Entgiftung des Serums wie der fluorescierenden Substanz stattgefunden. Da die Tiere ohne Agglutinierung zu zeigen absterben, ist zu schließen, daß die Alexinwirkung vollständig ausgeschaltet ist und somit nur mehr eine allerdings wesentlich herabgesetzte Substanzgiftwirkung vorliegt. Daß dem so ist, sieht man aus den Versuchen mit $^1/_{100}$ mol. Dichloranthracenzusatz. Hierbei leben die Tiere ohne sichtbare Störung selbst nach 24 Stunden. Es ist also Alexin- und Giftwirkung vollständig aufgehoben.

Geht man mit der Konzentration der fluorescierenden Substanz weiter herab, so tritt wieder die Alexinwirkung in Erscheinung. Die Konzentration reicht nicht mehr aus, das Alexin ganz zu entgiften.
Das gleiche Bild zeigt ein Versuch mit Eosin (Tetrabromfluorescein-Natrium).

Versuch II (Eosin).

Anordnung wie bei Versuch I; die Eosinkonzentrationen waren $^1/_{10}$, $^1/_{25}$, $^1/_{50}$, $^1/_{100}$, $^1/_{200}$ mol.

Eosin (nach der Mischung)	Rinderserum	Eintritt des Todes resp. der Agglutinierung	Bemerkung
ohne	mit	21′	Alexinwirkung
$^1/_{40}$ mol.	„	11′	keine Agglutinierung daher Substanzwirkung
$^1/_{100}$ „	„	100′	keine Agglutinierung daher Substanzwirkung
$^1/_{200}$ „	„	nach 24ʰ zum Teil lebend	Alexin- und Substanzwirkung fast aufgehoben
$^1/_{400}$ „	„	„ 24ʰ lebend	Alexin- und Substanzwirkung aufgehoben
$^1/_{800}$ „	„	„ 32′ agglutiniert	Alexinwirkung

Der Versuch ist ohne weiteres klar. Bei Zusatz von $^1/_{400}$ mol. Eosin ist der Punkt getroffen, bei dem einerseits die Wirkung der fluorescierenden Substanz, anderseits die Alexinwirkung aufgehoben ist. Bei höherem Eosinzusatz tritt die Eosingiftwirkung, bei niedererem die Alexinwirkung in Erscheinung.

Wie schon erwähnt, werden aber auch die fluorescierenden Stoffe als solche bei Serumzusatz verändert; das läßt sich an der Änderung ihrer optischen Eigenschaften (Fluorescenzhelligkeit und Absorption), ihrer physikalischen (Diffusionsvermögen) sowie ihrer chemischen (Lösungsverhältnis) ersehen. Für den Photobiologen am wichtigsten ist aber die Herabsetzung resp. Aufhebung ihrer sensibilisierenden Wirkung.

Da Hühnereiweiß sich ähnlich verhält wie Serum, dagegen

nicht die kolloiden Stoffe wie Leim, Gummi, Stärke usw. wird es sich hierbei um die Wirkung der im Serum enthaltenen Eiweißkörper handeln. Nun ist über die Beziehungen zwischen Farbsäuren resp. Farbbasen und den Eiweißstoffen bereits manches bekannt.

Die von Mathews[1]) gemachte Annahme einer Salzbildung hat vor allen Heidenhain[2]) experimentell zu begründen gesucht. Von seinen Beweisen seien hier folgende angegeben: Das basische Nilblau ändert durch Säurezusatz seine rote Farbe in Blau. Dasselbe tritt bei Eiweißzusatz an Stelle der Säure ein. Ebenso wird die blaue Kongosäure geradeso wie durch Alkalizusatz durch Eiweiß rot. A. Bethe[3]) hält die Beziehungen zwischen Gewebe und Farbbasen ebenfalls höchst wahrscheinlich für wirkliche Salzbildung.

Dieser Annahme einer chemischen Verbindung steht die von L. Michaelis[4]) und P. Zacharias[5]) vertretene Theorie einer physikalischen Bindung (Adsorption) gegenüber; hierbei würde es sich um einen ähnlichen Vorgang handeln wie bei der Vereinigung eines Kolloids mit einem entgegengesetzt geladenen Kolloid zu einem Kolloidkomplex. In der Tat zeigt das Verhalten der Farbsäuren viel Ähnlichkeit mit elektronegativen Kolloiden (E. Raehlmann[6]). Für einen solchen Adsorptionsvorgang spricht auch die interessante Beobachtung H. Arons[7]). Er wies nach, daß saure Farbstoffe resp. die freien Farbsäuren zu Eiweißlösungen in genügender Menge zugesetzt diese ihrer Hitzekoagulierbarkeit berauben. Es wirkt

---

[1]) A. Mathews, A contribution to the chemistry of cytological stayning American. Journ. of Physiol. 1898.

[2]) M. Heidenhain, Über chemische Umsetzungen zwischen Eiweißkörpern und Anilinfarben. Arch. f. d. ges. Physiol. 90, 115 bis 198; 96, 440 bis 472.

[3]) A. Bethe, Die Einwirkung von Säuren und Alkalien auf die Färbung und Färbbarkeit tierischer Gewebe. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 6, 399, 1905.

[4]) L. Michaelis, Pflügers Archiv 97, 634.

[5]) P. Zacharias, Chem.-Zeitg., 26, 289 bis 291.

[6]) E. Raehlmann, Neue ultramikroskopische Untersuchungen über Eiweiß organischer Farbstoffe, über deren Verbindungen und über die Färbung organischer Gewebe. Arch. f. ges. Physiol. 112, 128 bis 172, 1906.

[7]) Diese Zeitschr. 5, 413, 1907.

somit der Farbstoff auf das Eiweiß im Sinne eines „Schutzcolloids“.[1])

Die im folgenden niedergelegten Beobachtungen sprechen ebenfalls dafür, daß es sich bei der Bindung der Eiweißstoffe mit den fluorescierenden Farbstoffen um eine Adsorptionserscheinung handelt. Es wird gezeigt werden, daß bereits durch starke Verdünnung mit Wasser die Bindung zu lösen ist. Ferner ist untersucht worden, ob die Dunkelwirkung eine allen fluorescierenden Stoffen gemeinsame Eigenschaft ist, sodann in welcher Konzentration dieselbe in Erscheinung tritt und ob diese Bindung mit der photodynamischen Wirkung in einem ursächlichen Zusammenhange steht, vielleicht so, daß sie eine Vorbedingung für die photodynamische Wirkung ist.

I. Versuche mit Serum.

Anfänglich war in Aussicht genommen, zu prüfen, ob die Alexinwirkung des Serums auf Paramaecien, nachdem sie durch den Zusatz einer eben ausreichenden Menge von Eosin usw. aufgehoben war, bei Verdünnung wiederum in Erscheinung treten würde. Doch scheiterten diese Versuche daran, daß die Alexinwirkung auch ohne Eosinzusatz bereits bei sehr geringer Verdünnung nicht mehr auftrat.

Nun wird, wie bereits erwähnt, durch Serumzusatz auch die Eigenschaft der fluorescierenden Stoffe sensibilisierend zu wirken, aufgehoben oder wenigstens sehr herabgesetzt. Da die Sensibilisierung selbst in sehr hohen Verdünnungen noch auftritt, kommt die bei dem Alexin sich ergebende Schwierigkeit hierbei in Wegfall.

Versuchsobjekt war das Paramaecium caudatum. Als fluorescierender Stoff kam Eosin in Verwendung.

Versuch III.

Die Versuche waren so angeordnet: In drei Zylinder kamen je 1 ccm Rinderserum, dessen Alexin durch 2stündiges Erwärmen auf 54° C im Thermostat zerstört war, ferner je 1 ccm Eosin in einer Konzentration von $^1/_{100}$ mol. und 1 ccm Brunnenwasser. Drei weitere Zylinder waren ebenso beschickt, nur mit dem Unterschiede, daß statt Serum physiologische Kochsalzlösung zugegeben wurde. Je ein Zylinder aus den

[1]) Bechold, Zeitschr. f. physikal. Chem. 48, 385 bis 423.

beiden Reihen blieb unverdünnt, je einer erhielt einen Zusatz der 10fachen Menge von Brunnenwasser und je einer der 100fachen Menge. Aus diesen sechs Mischungen kamen je 3 ccm in Uhrschälchen und wurden mit 1 ccm Paramaecinkultur versetzt und belichtet. Als Lichtquelle diente eine Kohlenbogenreflektorlampe, deren Strahlen durch Magnaliumspiegel senkrecht zum Einfall gebracht wurden. Die Schälchen standen auf einer durch eine Wasserturbine drehbaren Scheibe, um die Belichtung in den einzelnen Proben möglichst gleichmäßig zu gestalten.

Die Ausschaltung der Wärmestrahlen erfolgte durch eine über den Schalen gelegene, in planparallelen Cuvetten eingeschlossene Lösung von Eisensulfat in Schichtendicke von 5,4 ccm und Konzentration von 7%. Der Moment, in dem die Paramaecien vollständig unbeweglich waren, galt als Eintritt des Todes.

		Tötungszeit
Unverdünnt	ohne Serum	5′
„	mit Serum	140′
10fach verdünnt	ohne Serum	20′
10 „ „	mit Serum	90′
100 „ „	ohne Serum	40′
100 „ „	mit Serum	50′

In der unverdünnten Probe ist durch den Serumzusatz die sensibilisierende Wirkung des Eosins stark gehemmt. Durch 10fache Verdünnung des Eosins ist die Sensibilisierung im Versuche ohne Serum schwächer, im Versuche mit Serum dagegen stärker als im ersteren Falle. Bei der 100fachen Verdünnung ist der Unterschied fast aufgehoben.

Während also durch Verdünnung mit Brunnenwasser in den Versuchen ohne Serum die Eosinwirkung immer mehr abnimmt, nimmt sie in den mit Serum zu. Dasselbe Bild zeigt ein ebenso angestellter Versuch mit dichloranthracendisulfonsaurem Natrium.

Versuch IV.

An Stelle der $^1/_{100}$ mol. Eosinlösung trat eine solche von $^1/_{50}$ mol. dichloranthracendisulfonsaurem Natrium. Die Verdünnung geschah mit 33-, 160- und 660facher Menge Brunnenwasser. Diese starken Verdünnungen waren möglich, da das dichloranthracendisulfonsaure Natrium noch in sehr schwacher Konzentration photodynamisch wirken kann.

1 ccm $^1/_{50}$ mol. dichloranthracendisulfonsaures Natrium + 1 ccm Wasser + 1 ccm Ochsenserum resp. 0,95% ClNa-Lösung bleiben teils unverdünnt, teils werden sie auf 100, 500 und 2000 ccm mit Wasser verdünnt. Je 3 ccm werden in Uhrschälchen mit 1 ccm Paramaecienkultur versetzt und kommen zur Belichtung. Belichtungsanordnung wie bei Versuch I.

Ohne Serum	Unverdünnt	Tot nach 15 Minuten
Mit Serum	„	Bleiben während der Belichtungsdauer von 3 Stunden am Leben
Ohne Serum	33fach verdünnt	Tot nach 17 Minuten
Mit Serum	33 „ „	„ „ 64 „
Ohne Serum	165 „ „	„ „ 37 „
Mit Serum	165 „ „	„ „ 39 „
Ohne Serum	660 „ „	„ „ 64 „
Mit Serum	660 „ „	„ „ 64 „

Schon durch die 33fache Verdünnung tritt die durch das Serum aufgehobene sensibilisierende Wirkung des Dichloranthracens wiederum in Erscheinung. Bei weiterer Verdünnung verschwindet die hemmende Wirkung des Serums ganz.

II. Versuche mit Tetanolysin.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt wurde, fand Flexner und Noguchi, daß das Eosin bereits im Dunkeln das Tetanolysin destruiert; versetzte er 2 ccm Tetanolysin mit 0,3 ccm 1⁰/₀iger Eosinlösung und ließ die Mischung bei 37⁰ C im Dunkeln eine Stunde stehen, so zeigte sie keine hämolytische Wirkung mehr. Die Labilität der Toxinlösungen gegen verschiedenartige chemische Einflüsse ist bekannt, so gegen Säuren, Alkalien, Oxydationsmittel usw. Daß aber die neutralen Farbstofflösungen „destruierend" wirken, muß auffallen. Wenn auch „Destruierung" noch lange nicht mit Zerfall des Toxinmoleküls gleichzusetzen ist, so muß man doch darunter eine derartige Veränderung verstehen, daß die Möglichkeit einer Reversibilität auszuschließen ist. Würde es nun — ähnlich wie bei den Serumversuchen in Abschnitt I — möglich sein, durch nachträgliche Verdünnung die Dunkelwirkung auf Tetanolysin wiederum aufzuheben, so wäre der Prozeß reversibel.

Von der Reversibilität der durch Säurewirkung entgifteten Derivate bakterieller Gifte ist zurzeit oftmals die Rede. Kyes, Sachs und Morgenroth[1]) zeigten, daß das Kobrahämolysin durch Ansäuern so verändert wird, daß seine chemischen (Affinität zum Antitoxin), sowie physikalischen (Thermolabilität) Eigenschaften geändert werden. Nach dem Neutralisieren stellt

---

[1]) Morgenroth, Berl. klin. Wochenschr. 1905. Diese Zeitschr. 1, 354, 1906; 2, 383, 1907.

sich aber eine vollständige Restitution ein. Allerdings ist nach den Versuchen von R. Doerr[1]) der Begriff Reversibilität insofern zu beschränken, als bei einzelnen Toxinen (so Diphtherietoxin) durch längere Einwirkung der Säure die reversiblen Toxinderivate irreversibel werden.

Es sollen unsere gemachten Verdünnungsversuche hier folgen.

Hierbei bedienten wir uns eines Trockenpräparates von Tetanustoxin. Zur Bereitung der Lösungen wurde das Präparat mit physiologischer Kochsalzlösung verrieben, 24 Stunden im Eisschrank stehen gelassen und dann die klare Lösung abzentrifugiert. Den Lösungen wurden sodann durch mehrmaliges Waschen und Abzentrifugieren vom Serum getrennte rote Blutkörperchen zugegeben und die Zeit, nach welcher Hämolyse eintrat, bestimmt. Die Bestimmung des Zeitpunktes geschah nach der von O. Gros[2]) angegebenen Methode:

Die zu prüfenden Lösungen kamen in Reagensgläser. Vor ihnen wurde in Entfernungen von $1^1/_2$ m eine Glühlampe von 5 Kerzen Lichtstärke aufgestellt und deren Bild mittels einer Linse in die Lösung projiziert. Zwischen Reagensglas und Lampe stand eine Papptafel, um fremdes Licht abzuhalten. In ihr war die Linse befestigt. Das Untersuchungszimmer war verdunkelt. Anfänglich sieht man in der Lösung nur einen hellen Schein; mit der fortschreitenden Hämolyse werden allmählich die Umrisse der Lampe sichtbar, und in einem bestimmten Zeitpunkt treten die Kohlefäden scharf hervor. Dieser Moment galt als Eintritt vollständiger Hämolyse.

A. Verdünnungsversuche.

Eine $10^0/_0$ Toxinlösung wurde zu gleichen Teilen mit physiologischer Kochsalzlösung resp. $^1/_{75}$ mol. Eosin versetzt. Nach einstündigem Stehen im Eisschrank wurden aus den beiden Mischungen je 0,1 ccm in Reagensgläser abpipettiert und 10 ccm $1^0/_0$ Blutkörperchenaufschwemmung zugegeben. Zwei Reagensgläser erhielten keinen weiteren Zusatz, zwei einen solchen von 20 ccm physiologischen ClNa und zwei einen solchen von 90 ccm. Die Bestimmung des Hämolyseeintrittes geschah wie oben angegeben.

---

[1]) R. Doerr, Diese Zeitschr. 7, 128, 1907.

[2]) O. Gros, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 57, 64 bis 79.

Versuch V.

		Eintritt der Hämolyse nach
ohne Esoin	unverdünnt	6′
mit „	„	90′
ohne „	3fach verdünnt	6′
mit „	„	8′
ohne „	10fach verdünnt	6′
mit „	„	6′

Der Versuch wurde mit einer höheren Konzentration von Eosin ($^1/_{25}$ mol.) wiederholt.

Versuch VI.

		Eintritt der Hämolyse nach
ohne Eosin	unverdünnt	6′
mit „	„	keine H. nach 12 Std.
ohne „	10fach verdünnt	6′
mit „	„	9′

Somit ist die bei Zusatz von $^1/_{25}$ mol. Eosin ganz aufgehobene hämolytische Wirkung des Tetanolysins nach 10facher Verdünnung mit Kochsalzlösung wiederum in Erscheinung getreten, und zwar in fast der gleichen Stärke wie beim Kontrollversuche ohne Eosin. Es kann sich also bei der Dunkelwirkung der fluorescierenden Stoffe um keine „Destruierung" des Tetanolysins handeln, denn eine Zerstörung des Körpers liegt nicht vor.

Nun haben aber Flexner und Noguchi ihre Versuche bei 37° C angestellt. Wir haben deshalb obige Versuche in der Weise abgeändert, daß ein Teil des mit Eosin versetzten Tetanolysins eine Stunde im Thermostat bei 37° C, ein Teil aber im Eisschrank ebensolange stehen blieb.

Versuch VII.

Eosin wurde in Konzentration von $^1/_{25}$ mol. verwendet wie in Versuch VI.

		Eintritt der Hämolyse nach	
		kalt	warm
ohne Eosin	unverdünnt	6′	6′
mit „	„	keine H.	keine H.
ohne „	10fach verdünnt	6′	7′
mit „	„	14′	keine H.

Zu unserer Überraschung blieb beim Stehen in der Wärme und nachträglicher Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung das Wiederauftreten der hämolytischen Wirkung aus.

Eine Erklärung hierfür könnte darin liegen, daß die anfänglich lockere und durch Verdünnung trennbare Bindung in der Wärme fester wird oder aber, was wahrscheinlicher ist, daß das mit dem Eosin locker gebundene Hämolysin thermolabiler geworden ist als das Tetanolysin selbst.

Ist letzteres richtig, so ergibt sich die Wahrscheinlichkeit, daß auch das in der Kälte stehende Tetanolysin-Eosin bei langem Stehen rascher zerstört wird als die Kontrollprobe ohne Eosin.

Flexner und Noguchi haben daher bei ihren Versuchen im Thermostat bei 37° C mit Recht von einer Destruierung des Tetanolysins durch Eosin im Dunkeln gesprochen.

B. Zur Frage, in welcher Konzentration Eosin und Rose bengale die Dunkelwirkung zeigen und ob die Wirkung allen fluorescierenden Stoffen zukommt.

Versuche mit verschiedenen Konzentrationen von Eosin und Rose bengale.

Versuch VIII (Eosin).

1 ccm einer 0,5% Toxinlösung wird versetzt mit 0,1 ccm 0,95% ClNa-Lösung resp. mit Eosinlösungen verschieden molekularer Konzentration, wobei natürlich als Lösungsmittel physiologische Kochsalzlösung benutzt wurde. Dann erfolgte der Zusatz von 1 ccm gewaschener, roter Blutkörperchen von der Dichte, wie sie einer 0,5% Blutverdünnung entspricht.

Eosinkonzentration nach der Mischung	Hämolyse nach
ohne	8′
$^1/_{4000}$ mol.	$7^1/_2{}^h$
$^1/_{10\,000}$ „	$3^1/_4{}^h$
$^1/_{20\,000}$ „	45′
$^1/_{100\,000}$ „	15′

Somit hat Eosin selbst in starker Verdünnung ($^1/_{100\,000}$ mol.) im Dunkeln die Wirkung des Tetanolysins vermindert.

Stärker noch als Eosin wirkt das Rose bengale (Tetrachlortetrajodfluoresceinnatrium).

Versuch IX (Rose bengale).

Rose bengale	Hämolyse nach
ohne	8′
$^1/_{20\,000}$	keine Hämolyse nach 6^h
$^1/_{100\,000}$	„
$^1/_{400\,000}$	22′
$^1/_{100\,0000}$	10′

Versuche mit anderen fluorescierenden Stoffen.

Von anderen Stoffen wurden noch untersucht: Fluoresceinnatrium und Fluorindindisulfonsaures Natrium.

Versuch X.

		Hämolyse nach
	ohne	8′
$^1/_{4000}$ mol.	Fluorescein Na	8′
$^1/_{4000}$ „	Fluorindindisulf. Na	8′
$^1/_{4000}$ „	Eosin	450′
$^1/_{2000}$ „	Fluorescein Na	8
$^1/_{2000}$ „	Fluorindindisulf. Na	8
$^1/_{2000}$ „	Eosin	keine Hämolyse nach 12^h

Die Anordnung der folgenden Versuche ist — um noch höhere Konzentrationen zu prüfen — so gewählt, daß zu 0,5 ccm Tetanotoxin (0,5 %) 0,5 ccm fluorescierende Substanz und 0,1 ccm 2,5 % Blutkörperchen zugesetzt waren. Somit war Toxin- und Blutkörperchenmenge annährend gleich wie vorher, die fluorescierende Substanz aber verzehnfacht.

Versuch XI.

		Hämolyse nach
	ohne	$7^1/_2$
$^1/_{400}$	Fluorescein Na	$7^1/_2$
$^1/_{400}$	Fluorindindisulf. Na	8
$^1/_{400}$	Äsculin	$7^1/_2$
	ohne	7
$^1/_{1000}$	Methylenblau	8
$^1/_{1000}$	Krystallviolett	27
$^1/_{1000}$	Safranin	keine Hämolyse

Der Verwendung dieser höheren Konzentration von Methylenblau und Krystallviolett stellte sich die Schwierigkeit entgegen, daß das Reflexbildchen nicht mehr zu sehen war. Es wurde deshalb von Zeit zu Zeit ein Tropfen entnommen und versucht, den Eintritt der Hämolyse mit dem Mikroskope festzustellen. Selbst bei Verwendung von $^1/_{400}$ mol. Krystallviolett und $^1/_{400}$ mol. Methylenblau trat Hämolyse ein, besonders rasch bei Methylenblau.

Somit hat Fluoresceinnatrium und Fluorindindisulfonsäure keine sicher nachweisbare Dunkelwirkung auf Tetanolysin. Ebenso verhält sich Äsculin und Methylenblau. Krystallviolett wirkt äußerst schwach. Sehr starke Dunkelwirkung zeigen Eosin, Rose bengale und Phenosafranin.

C. Ist die Bindung von Toxin und fluorescierenden Stoffen eine Vorbedingung für die sensibilisierende Wirkung?

Das Fehlen der Dunkelwirkung bei Fluorescein Na, Fluorindindisulfonsäure und Äsculin fällt insofern auf, als diesen Stoffen ein äußerst geringes Sensibilisierungsvermögen auf Zellen und eine Reihe von Toxinen und Fermenten zukommt. Träfe dieses Fehlen der Lichtwirkung auch bei Tetanolysin zu, so würde sich die Vermutung aufdrängen, ob nicht etwa die bereits im Dunkeln eintretende Bindung des Sensibilisators mit dem zu sensibilisierenden Objekt eine Vorbedingung für den Sensibilisierungsvorgang sei. Dafür spräche auch die viel stärkere Dunkelwirkung des Rose bengale gegenüber Eosin entsprechend seiner Überlegenheit als Sensibilisator.

Es war daher nötig, einige **Sensibilisierungsversuche** mit **Tetanolysin** anzustellen.

Zu dem Zwecke wurde in Reagensgläser je 5 ccm einer 0,75 % Toxinlösung gebracht und 5 ccm 0,95 % ClNa-Lösung resp. $^1/_{5000}$ mol. Fluoresceinnatrium, $^1/_{5000}$ mol. Eosin und $^1/_{5000}$-mol. Methylenblau zugegeben. Zur Belichtung diente direktes Sonnenlicht, wobei mittels vorgelegter Eisensulfatlösung die Wärmewirkung ausgeschaltet war. Nach bestimmten Zeiten wurde 1 ccm abpipettiert und mit 0,5 ccm 1 % Blutkörperchenaufschwemmung gemischt und im Dunkeln das Eintreten der Hämolyse beobachtet. Die Beobachtungsdauer war 12 Stunden.

Versuch XII.

Belichtungsdauer	Eintritt der Hämolyse bei				
	ClNa	Fluorescein-Na	Esoin	Rose bengale	Methylenblau
10′	4	4	4	4	4
30′	4	6	10	20	120
50′	4	60	keine H.	keine H.	keine H.
70′	4	keine H.	„	„	„

Das Ansteigen der photodynamischen Wirkung vom stark fluoreszierenden Fluorescein Na, zum schwächer fluorescierenden Eosin und kaum mehr Fluorescens zeigenden Rose bengale war nach allen früheren Sensibilisierungsversuchen zu erwarten. Es entspräche diese Reihenfolge auch der Stärke der Dunkelwirkung.

Im Gegensatz hierzu kommt dem Methylenblau, das so gut wie keine Dunkelwirkung zeigt, sehr starke Lichtwirkung zu.

Ferner hat, wie folgender Versuch zeigt, das im Dunkeln wirkungslose Äsculin und die Fluorindindisulfonsäure eine, wenn auch sehr schwache Lichtwirkung.

Versuch XIII.

Zum Versuche kam: Äsculin und Fluorindindisulfonsäure in Konzentration von $^1/_{1000}$ mol., ferner Phenosafranin in einer solchen von $^1/_{50000}$ mol. Belichtungsdauer: 3 Stunden in der Sonne mit Eisensulfatvorlage.

	Hämolyse nach
ohne fluoresc. Substanz	4′
Äsculin	12′
Fluorindindisulfons.	$12^1/_2$′
Phenosafranin	keine H.

Ein Zusammenhang zwischen Dunkelwirkung und Sensibilisierung besteht somit nach diesen Versuchen nicht.

III. Dunkelwirkung auf andere Toxine und Fermente.

Zu den weiteren Untersuchungen benutzten wir noch ein pflanzliches Toxin: das Ricin. Eine 1 %ige Lösung (in 5 % ClNa) wurde zu gleichen Teilen mit $^1/_{50}$ mol. Eosin, resp. Kochsalzlösung, versetzt. Verschieden große Mengen wurden dann in Reagensgläser gefüllt und mit 0,1 ccm frischem, defibriniertem Schweineblut versetzt. Nach einstündigem Stehen wurde die agglutinierende Wirkung des Ricins bestimmt.

Versuch XIV.

Ricinmenge	Agglutinierung	
	ohne Eosin	mit Eosin
0,5 ccm Ricin	total	total
0,3 „ „ + 0,2 ccm 0,95 % ClNa	„	„
0,1 „ „ + 0,4 „ „	„	gering
0,05 „ „ + 0,45 „ „	stark	angedeutet
0,025 „ „ + 0,475 „ „	angedeutet	fehlt

Trotz der hohen Eosinkonzentrationen ist die Dunkelwirkung auf Ricin äußerst gering. Es ist sogar fraglich, ob diese Spur von Wirkung auf den gleichen Grund zurückgeführt werden darf wie die Dunkelwirkung auf Tetanolysin, denn Verdünnungsversuche heben die Wirkung nicht auf.

Versuch XV.

Ricinmenge	Agglutinierung	
	ohne Eosin	mit Eosin
0,1 ccm Ricin + 0,4 ccm 0,95 % ClNa	total	angedeutet
0,1 „ „ + 15 „ „	„	„

Von Fermenten wurde noch die Katalase und die Invertase zu den Versuchen herangezogen.

An Stelle isolierter Katalase verwendeten wir Rinderblut, das reich an Katalase ist. Die Bestimmung der Fermentwirkung geschah durch Messung des während einer bestimmten Zeit aus H_2O_2 abgespaltenen O. Die sonst übliche maßanalytische Bestimmung des unzerlegten H_2O_2 nach Abbruch der Fermentwirkung mußte infolge der großen Eosinmengen unterbleiben.

Versuch XVI.

Anordnung: Eine durch Zentrifugieren und Waschen vom Serum getrennte Blutkörperchenaufschwemmung von der Dichte, wie sie einer 10%igen Blutverdünnung entspricht, wurde zu gleichen Teilen mit $^1/_{25}$ mol. Eosin resp. Wasser gemengt. Von diesen Lösungen kam je 1 ccm zu 30 ccm H_2O_2 in geeichte Reagensgläser aus Jenenser Glas, die vor dem Versuche ausgekocht waren. Ihr Rauminhalt war 30 ccm. Nachdem sie mit den Lösungen beschickt waren, wurden sie mit einem Gummistopfen, durch dessen Bohrung ein knieförmig gebogenes, kurzes Glasrohr gesteckt war, luftdicht verschlossen und die sich entwickelnde Menge von Sauerstoff abgelesen. Der Versuch ergab, daß die Entwicklung von Sauerstoff in beiden Röhren ganz gleichmäßig vor sich ging uud somit keine Dunkelwirkung nachweisbar war.

Ebenso negativ fielen die Versuche mit Invertase aus.

Versuch XVII.

Anordnung: Eine durch Zentrifugieren geklärte 0,8%ige Invertaselösung (Präparat v. E. Merck) wurde zu gleichen Teilen mit $^1/_{10}$- und $^1/_{50}$ mol. Eosinlösung resp. Wasser versetzt. Nach einstündigem Stehen im Dunkeln kamen je 5 ccm in Reagensgläser unter Zusatz von 15 ccm 17% Rohrzuckerlösung. Nach einer Invertierungsdauer von 14 Stunden im Dunkelzimmer wurde im Polarisationsapparate die Abnahme der Rechtsdrehung durch die Bildung von Invertzucker bestimmt. Anfängliche Drehung war 8,48°. Vor der Ablesung mußte aber das Eosin entfernt werden. Es geschah dies durch Ausfällung des Tetrabromfluoresceins mit Salzsäure.

	Ablesung	Somit gebildeter Invertzucker in g	Invertierung in %
ohne Eosin	4° 00′	5,09	39,9
mit $^1/_{100}$ mol. „	4° 04′	5,02	39,4
„ $^1/_{20}$ „ „	4° 16′	4,80	37,6

Gegen diese Versuchsanordnung könnte mit Recht der Einwand erhoben werden, daß durch die starke Verdünnung von Eosininvertase mit Rohrzuckerlösung die bestandene Dunkelwirkung aufgehoben wurde. Deshalb wurde in einer zweiten Versuchsreihe den 17 % Rohrzuckerlösungen so viel Eosin zugegeben, daß ihre Eosinkonzentration die gleiche war wie die der Invertaselösungen. Somit ging auch der Invertierungsprozeß in einer hoch konzentrierten Eosinlösung vor sich.

Versuch XVIII.

Anordnung: 0,8 % Invertaselösung wurde zu gleichen Teilen mit $^1/_{20}$ mol. und $^1/_{100}$ mol. Eosin resp. Wasser versetzt. Nach $^1/_4$stündigem Stehen im Dunkeln kam zu je 5 ccm dieser Mischungen 15 ccm einer Lösung von 17 % Rohrzucker + $^1/_{20}$ resp. $^1/_{100}$ mol. Eosin resp. Wasser. Die Invertierungsdauer war 16 Stunden.

	Ablesung	Somit gebildeter Invertzucker in g	Invertierung in %
ohne Eosin	2° 57′	6,29	49,3
mit $^1/_{200}$ „	3° 00′	6,23	49,0
„ $^1/_{40}$ „	2° 55′	6,32	49,5

Somit zeigt das Eosin keine Dunkelwirkung auf die Invertase.

Dem steht die Tatsache gegenüber, daß die ziemlich lichtbeständige Invertase bei Gegenwart eines Sensibilisators äußerst lichtempfindlich ist. Bei Verwendung von $^1/_{5000}$ mol. Eosin genügen 10 Minuten Sonnenbelichtung, um die spezifische Fermentwirkung fast gänzlich aufzuheben.

Es besteht also kein Zusammenhang zwischen Dunkelwirkung und Lichtwirkung. Deshalb ist auch der Vorstellung, als handle es sich bei der photodynamischen Wirkung der fluorescierenden Stoffe nur um die Steigerung einer auch im Dunkeln durch diese Stoffe hervorgerufene Reaktion, die experimentelle Grundlage entzogen.

IV. Einfluß von Alkali auf die Dunkelwirkung.

Hat die Reaktion für das Zustandekommen der Dunkelwirkung eine Bedeutung?

Zur Lösung dieser Frage diente wiederum die im Dunkeln

stattfindende gegenseitige Beeinflussung von Serum und fluorescierenden Stoffen, die sich unter anderem bei einem daran anschließenden Lichtversuche in der Verminderung der photodynamischen Wirkung äußert. Versuchsobjekte waren die Paramaecien. Dieselben vertragen nach R. Dax Natronlauge in einer Konzentration von $^1/_{400}$ norm. mehrere Stunden lang ohne merkbare Schädigung.

Nun ist aber vorher zu prüfen, inwieweit die Lauge das Sensibilisierungsvermögen des Eosins allein — also ohne Serum — beeinflußt.

Versuch XIX.

Versuchsanordnung: 1 ccm $^1/_{100}$ mol. Eosin wurde mit 1 ccm Wasser und 1 ccm $^1/_{100}$ norm. Natriumhydroxyd resp. Wasser und 1 ccm Paramaecienkultur versetzt. Das Gemenge kam in Uhrschälchen zur Belichtung wie in Versuch I.

	Eintritt des Absterbens nach
mit Lauge	16′
ohne „	12′

Somit ist durch die Anwesenheit der Hydroxylionen die Sensibilisierungsstärke des Eosins herabgesetzt. Das gleiche aber tritt ein bei Verwendung von Natriumcarbonat, das Paramaecien noch in höherer Konzentration $^1/_{100}$ bis $^1/_{200}$ norm. gut vertragen können.

Versuch XX.

Versuch wie vorher. Nur wurde an Stelle der Lauge $^1/_{50}$ norm. Na_2CO_3 verwendet.

	Eintritt des Absterbens nach
mit Na_2CO_3	15′
ohne „	8′

Es wäre nun zu vermuten, daß, wenn Serum zugegen ist, diese sensibilisierungshemmende Wirkung des Alkalis ebenfalls einträte.

Zu diesem Zwecke wurden die vorhergehenden Versuche wiederholt, nur mit dem Unterschiede, daß vor der Belichtung dem Eosin im Dunkeln Serum zugemengt wurde.

Versuch XXI.

Anordnung: 1 ccm Serum, dessen Alexin durch Erwärmen zerstört war, wurde im Dunkeln mit 1 ccm $^1/_{100}$ mol. Eosin versetzt. Nach längerem Stehen kam 1 ccm $^1/_{100}$ norm. NaOH resp. Wasser hinzu. Belichtung wie vorher.

	Eintritt des Absterbens nach
mit Lauge	100′
ohne „	180′

Im Versuche mit Lauge ist, im Gegensatz zu den vorhergehenden Versuchen ohne Serum, das Absterben der Tiere früher eingetreten als im Kontrollversuche.

Noch viel deutlicher tritt dieses Verhalten des Alkalis bei Verwendung von $^1/_{50}$ norm. Na_2CO_3 in Erscheinung.

Versuch XXII.

An Stelle von NaOH ist $^1/_{50}$ norm. Na_2CO_3 zugesetzt.

	Eintritt des Absterbens nach
mit Na_2CO_3	18′
ohne „	180′

Diese Versuche erlauben den Schluß, daß durch den Zusatz von Alkali die Bindung zwischen den Eiweißstoffen des Serums und den fluorescierenden Substanzen erschwert ist resp. nicht mehr zustande kommt.

Ergebnisse.

1. Sehr viele fluorescierende Stoffe wirken selbst ohne Lichtzutritt auf bestimmte Stoffe im Serum (Alexin) sowie auf Toxine (Tetanolysin) ein und hemmen deren spezifische Wirkungen.

2. Eine gemeinsame Eigenschaft aller fluorescierenden Stoffe ist dies nicht.

3. Die zur Dunkelwirkung nötigen Konzentrationen der fluorescierenden Stoffe sind im Vergleiche zu denen, die photodynamisch wirken, hohe.

4. Daß es sich bei der Dunkelwirkung um eine Adsorptionserscheinung handelt, ist daraus zu schließen, daß es durch

nachträgliche Verdünnung möglich ist, die Wirkung wiederum aufzuheben — Reversibilität —.

5. Findet die Dunkelwirkung auf Toxin (Tetanolysin) bei erhöhter Temperatur (37 ° C) statt, so ist die Bindung irreversibel, vielleicht nur scheinbar durch die Zerstörung des durch die Bindung thermolabiler gewordenen Toxins.

6. Die Anwesenheit von Alkali setzt die Dunkelwirkung sehr bedeutend herab.

7. Eine Beziehung zwischen Dunkelwirkung und Lichtwirkung besteht nicht. Die Vermutung, daß die bereits im Dunkeln eintretende Bindung eine Bedingung für die Lichtwirkung wäre, ist auszuschließen. Dafür spräche zwar der bei einer Anzahl fluorescierender Stoffe (Fluorescein-Natrium, Eosin, Rose bengale) bestehende Parallelismus zwischen Stärke der Dunkelwirkung und der photodynamischen Wirkung. Anderseits aber kommt dem auf Tetanolysin stark sensibilisierend wirkenden Methylenblau keine Dunkelwirkung zu. Außerdem fehlt die Dunkelwirkung bei der sehr leicht sensibilisierbaren Invertase.

Über die Peroxydasen der Tiergewebe.

Von

F. Battelli und L. Stern.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Genf.)

(Eingegangen am 18. Juli 1908.)

Das Vorkommen echter Peroxydasen in der Pflanzenwelt ist namentlich seit den Arbeiten von Bach und Chodat allgemein bekannt. Im Tierreiche, namentlich in den höheren Tierorganismen, sind echte Peroxydasenvon Linossier[1]) und von Moitessier[2]) in den Leukocyten nachgewiesen worden. Die verschiedenen Organe können unter gewissen Bedingungen die klassischen Peroxydasenreaktionen (Guajacbläuung, Pyrogallolreaktion usw.) geben, aber das Hämoglobin, selbst in minimalen Mengen, bewirkt energisch diese Reaktionen. Es folgt daraus, daß die verschiedenen Peroxydasereaktionen, die mit Hilfe der Gewebe der höheren Tiere erhalten werden, sehr leicht dem darin in mehr oder minder großer Menge enthaltenen Hämoglobin zugeschrieben werden kann.

v. Czyhlarz und v. Fürth[3]) haben in der Oxydation des Jodwasserstoffs in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd eine Reaktion gefunden, die dazu geeignet sei, das Vorhandensein echter Peroxydasen in den Tiergeweben unabhängig vom Hämoglobin anzuzeigen.

---

[1]) Linossier, Contribution à l'étude des ferments oxydants sur la peroxydase des pus. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 50, 373, 1898.

[2]) Moitessier, Sur le rôle de la peroxydase dans les réactions colorées obtenues avec le sang. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 57, 373, 1904.

[3]) E. v. Czyhlarz und O. v. Fürth, Über tierische Peroxydasen. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 10, 358, 1907.

Diese Autoren haben in der Tat gezeigt, daß die Jodstärkereaktion bei Anwendung von Hämoglobin in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd negativ ausfällt.

Mit Hilfe dieser Reaktion haben v. Czyhlarz und v. Fürth das Vorkommen einer echten Peroxydase im Eiter sowie in den verschiedenen lymphoiden Geweben (Milz, Lymphdrüse, Knochenmark) nachgewiesen.

Die eben genannten Autoren haben den Reaktionsverlauf der echten Peroxydase bei der Oxydation der Leukobase des Malachitgrüns auf spektrophotometrischem Wege studiert. Sie haben die Beobachtung gemacht, daß die Oxydation der Leukobase des Malachitgrüns durch echte Peroxydase in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd eine für Fermentwirkungen charakteristische Kurve aufweist, während bei der Oxydationswirkung des Hämoglobins Ähnliches nicht beobachtet wurde. v. Czyhlarz und v. Fürth schließen daraus, daß, während man bei der „echten" Peroxydase es mit einem Fermente zu tun habe, die Oxydationswirkung des Blutes oder des Hämoglobins bloß eine peroxydaseartige Wirkung sei und keinen enzymatischen Charakter besitze.

Eine positive Jodstärkereaktion, d. h. eine Beschleunigung der Blaufärbung der Jodstärke in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd haben v. Czyhlarz und v. Fürth nur mit Eiter und lymphoiden Geweben verzeichnet. Die übrigen darauf untersuchten Gewebe haben bloß negative Resultate geliefert. Doch weisen die Autoren selbst darauf hin, daß ein negatives Resultat keine zwingende Beweiskraft besitzt. Durch verschiedene in den Geweben enthaltene Substanzen kann das bei der Oxydation freiwerdende Jod gebunden werden, und die Bläuung des Stärkekleisters somit verhindert werden.

Die Versuche, die Peroxydase der Tiergewebe durch Alkoholfällung darzustellen, haben keine befriedigende Resultate geliefert. Der Alkoholniederschlag besitzt keine oder nur eine äußerst geringe Oxydationswirkung gegenüber Jodwasserstoffsäure in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd, hingegen scheint das Ferment gegen höhere Temperaturen sehr wenig empfindlich zu sein. — Auf Siedetemperatur erhitzt, behält dasselbe einen Teil seines Oxydationsvermögens bei.

Die Verfasser finden, daß die echte Eiterperoxydase mit dem glykolytischen Ferment des Blutes nicht identisch sei.

Buckmaster[1]) bestätigt die Angabe der früher genannten Autoren, daß die Oxydation der Leukobase des Malachitgrüns in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd durch Hämoglobin mit einer echten Peroxydasewirkung nicht zu verwechseln sei. Er bezeichnet das Hämoglobin als eine Pseudoperoxydase.

Die Oxydation der Guajactinktur durch das Blut, das Hämoglobin oder die Hämoglobinderivate ist von einer großen Zahl von Forschern studiert worden. Unsere Untersuchungen stehen jedoch damit in keinem direkten Zusammenhange, weshalb wir auf diese Arbeiten hier nicht eingehen wollen.

Wir wollen hier nur kurz der jüngst in dieser Zeitschrift erschienenen umfangreichen Arbeit von W. Ostwald[2]) über den Einfluß des Lichtes auf die Peroxydasen und die Katalase einiger wirbellosen Tiere erwähnen, ohne auf dieselbe näher einzugehen, da die Untersuchungen des Verfassers keine direkten Beziehungen zu den unsrigen haben. — Desgleichen wollen wir auch die Arbeiten über die Pflanzenperoxydasen nicht weiter berücksichtigen.

Bei ihren Untersuchungen der tierischen Peroxydasen haben v. Czyhlarz und v. Fürth[3]), wie wir bereits gesehen haben, das Wasserstoffosuperoxyd verwandt. Dieses Peroxyd bietet einen großen Nachteil, und zwar wird das Wasserstoffsuperoxyd durch Katalase sehr schnell und energisch unter Entwicklung von inaktivem Sauerstoff zersetzt. Wir haben deshalb in unseren Versuchen das Wasserstoffsuperoxyd durch das Äthylhydroperoxyl, auf das die Katalase keine zerstörende Wirkung ausübt, ersetzt.

Außer der Oxydation der Jodwasserstoffsäure haben wir die Oxydation der Ameisensäure durch die Tiergewebe in Gegenwart von Peroxyd studiert. Wie wir später sehen werden,

---

[1]) G. A. Buckmaster, The pseudo-peroxdase reaction between haemoglobin, its derivatives and the leucobase of malachite green. Journ. of Physiol. 37. (Proceedings of the physiol. Soc. morph. 1908.)

[2]) Wolfgang Ostwald, Über die Lichtempfindlichkeit tierischer Peroxydasen und über die Beziehungen dieser Eigenschaft zu den Erscheinungen des tierischen Phototropismus. Diese Zeitschr. **10**, **1**, 1908.

[3]) l. c.

stellt letztere ein bedeutend zuverlässigeres Reagens dar, mit dessen Hilfe man recht befriedigende quantitative Peroxydasebestimmungen ausführen kann.

I. Oxydation der Jodwasserstoffsäure.

a) Vorversuche.

Bekanntlich besteht die bisher angewandte Reaktion in einer Oxydation der Jodwasserstoffsäure durch Peroxydase in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd. Das dabei frei werdende Jod färbt den im Reagens vorhandenen Stärkekleister blau. Die Reaktion geht spontan ohne Zusatz von Peroxydase langsam vor sich. Es handelt sich also um eine Beschleunigung der Reaktion, die sich durch eine schnellere Bläuung des Stärkekleisters kundgibt.

Die Vorversuche, die wir zur Bestimmung der für das Zustandekommen der Reaktion günstigsten Bedingungen angestellt haben, haben folgendes Resultat ergeben.

Die Beschleunigung der Oxydation der Jodwasserstoffsäure durch die verschiedenen tierischen Gewebe in Gegenwart von Wasserstoffsuperoyd ist mehr oder weniger durch den Einfluß zweier Arten von Substanzen gehemmt. Die erste Gruppe umfaßt die Katalase, durch deren Wirkung das Wasserstoffsuperoxyd unter Entwicklung von inaktivem Sauerstoff zersetzt wird. — Wenn also ein Gewebe reich an Katalase ist, wie es zum Beispiel bei der Leber und der Niere der Fall ist, so kann die Wasserstoffsuperoxydzersetzung so energisch sein, daß die Oxydation der Jodwasserstoffsäure wegen Mangels an Wasserstoffsuperoxyd nicht oder nur sehr langsam zustande kommen kann. — Es ist also die Gegenwart von großen Katalasemengen, die die Bläuung des Stärkekleisters bei der Jodwasserstoffreaktion durch die Leber und die Niere in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd verhindert.

Anderseits darf man keine allzu großen Mengen Wasserstoffsuperoxyds anwenden, weil in diesem Falle die spontane Bläuung des Stärkekleisters ohne Zusatz von Peroxydase sehr schnell vor sich geht.

Zur zweiten Gruppe gehören die reduzierenden Substanzen, die Substanzen, die eine große Affinität für Jod besitzen u. a. Der chemische Charakter dieser Körper sowie die Art und Weise ihrer Wirkung bei der Reaktion von Jodwasserstoffsäure + Peroxyd ist von uns nicht näher untersucht worden. Man kann jedoch annehmen, daß die Farbenreaktion hauptsächlich durch den Umstand verhindert wird, daß das freiwerdende Jod von den in den Gewebsauszügen sich vorfindenden eiweißartigen und sonstigen Substanzen gebunden wird. — Wir wollen sie kurz als jodbindende Körper bezeichnen, ohne damit sagen zu wollen, daß dieselben nicht auch in einer andern Weise wirken könnten.

Um die Peroxydase der verschiedenen Gewebe der höheren Tiere mit Hilfe des Reagens Jodwasserstoffsäure + Peroxyd eingehender

studieren zu können, müßte man vor allen Dingen den Einfluß der Katalase sowie der jodbindenden Substanzen aufheben oder vermindern.

Wir haben zuerst versucht, die beiden Fermente Katalase und Peroxydase voneinander zu trennen. Alle unsere Versuche in dieser Richtung sind mißglückt. Wir haben sodann versucht, die Katalase zu zerstören, ohne die Peroxydase zu schädigen, indem wir die Gewebe der Einwirkung höherer Temperaturen sowie der Wirkung von Säuren und Alkalien aussetzten. Aber auch diese Versuche schlugen fehl. Die Zerstörung der Katalase war stets von einer Vernichtung der Peroxydase begleitet. Wir versuchten schließlich, das Wasserstoffsuperoxyd durch ein Peroxyd zu ersetzen, das von der Katalase nicht angegriffen werde.

Das Terpentin, welches mit Erfolg bei der Guajacprobe angewandt wird, erwies sich als unbrauchbar bei der Jodstärkereaktion. Es tritt keine Bläuung des Stärkekleisters ein, weder spontan noch nach Hinzufügen von Peroxydase. Zusatz von etwas Terpentin hemmt vielmehr die spontane Bläuung der Jodstärke durch Wasserstoffsuperoxyd. Bessere Resultate haben wir mit einem anderen Peroxyd — dem Äthylhydroperoxyd — erzielt. Bach und Chodat[1]) hatten bereits darauf hingewiesen, daß die Katalase keine Wirkung auf das Äthylhydroperoxyd ausübt. Durch Anwendung dieses Peroxyds kann also die hemmende Wirkung der in den Gewebsauszügen sich vorfindenden Katalase ausgeschaltet werden. Leider haben wir die Beseitigung der jodbindenden Körper nicht erreichen können. Durch längeres Dialysieren gelingt es zwar. einen Teil dieser Körper zu beseitigen. Der größte Teil bleibt jedoch zurück. Die einzige Möglichkeit, den hemmenden Einfluß dieser Substanzen zu vermindern, besteht darin, die Gewebsauszüge recht stark zu verdünnen. Konzentrierte Extrakte geben häufig negative Resultate. Oft verzögern sie die spontane Bläuung des Stärkekleisters; manchmal verhindern sie sogar die Peroxydasereaktion eines andern aktiven Extraktes. In genügend starker Verdünnung geben dieselben Extrakte oft sehr deutliche positive Resultate.

b) Definitive Methode.

Das Reagens wird auf folgende Weise bereitet· 1 Liter Stärkekleister, enthaltend 3 g Stärke wird mit 500 ccm einer 1%igen Jodkaliumlösung gemischt und das Ganze mit 2 ccm einer 10%igen Essigsäurelösung angesäuert. Der Säuregrad beträgt demnach $^1/_{7500}$ Essigsäure. Durch Vorversuche hatten wir festgestellt, daß dieser Säuregrad der für die Reaktion günstigste ist. Das Reagens muß so frisch wie möglich genommen werden. Längeres Stehenlassen ist zu vermeiden, da das Reagens sich alsdann unfähig erweist, in Gegenwart eines Peroxyds sich blau zu färben. Oft erhält man dann eine

---

[1]) A. Bach und R. Chodat, Untersuchungen über die Rolle der Peroxyde in der Chemie der lebenden Zelle. VI. Über Katalase. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 36, 1756, 1903.

rotbraune Färbung zuweilen bleibt jede Färbung aus (vermutlich findet eine Bildung von Erythrodextrin oder Achrodextrin statt.)

Das Äthylhydroperoxyd wird nach den Angaben von v. Baeyer und Villiger bereitet. 100 g Diäthylsulfat werden mit 115 g 30%iger Hydroperoxydlösung, 175 g Kaliumhydroxyd und 600 ccm Wasser bis zum völligen Verschwinden des Diäthylsulfats geschüttelt und das angesäuerte Reaktionsprodukt auf dem Luftbade überdestilliert. Das so erhaltene Produkt wird von neuem unter vermindertem Drucke destilliert und jodometrisch titriert. Die so erhaltene Flüssigkeit wird von Katalase nicht angegriffen, d. h. es findet keine Gasentwicklung nach Hinzufügen von Katalase statt. In unseren Versuchen haben wir uns einer 0,1%igen Lösung bedient.

Das zu untersuchende Gewebe wird mit Sand fein zerrieben und mit dem 5fachen Volumen Wasser versetzt. Man erhält so eine Suspension, die man nach Belieben durch Hinzufügen von Wasser verdünnt. Die Verdünnung geschieht am liebsten unmittelbar vor dem Versuche, weil stärker verdünnte Gewebsauszüge die Fähigkeit, Jodwasserstoffsäure zu oxydieren, mehr oder weniger einbüßen. Die Gewebssuspensionen werden so frisch wie möglich benutzt.

Die Versuchsanordnung ist folgende: In einem gewöhnlichen Reagensglase werden zu 1 ccm der Jodstärkelösung 1 Tropfen des zu untersuchenden, mehr oder weniger verdünnten Gewebsextraktes und 2 Tropfen einer 0,1%igen Äthylhydroperoxydlösung hinzugefügt und das Ganze auf 2 ccm mit Wasser aufgefüllt und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. In jedem Versuche wird eine Kontrollprobe in derselben Weise, nur unter Ausschluß des Gewebsextraktes, ausgeführt und die Farbe der beiden Reaktionsgemische miteinander verglichen. Bei unserer Versuchsanordnung tritt die Bläuung des Stärkekleisters in der Kontrollprobe nach ungefähr 9 bis 10 Minuten ein. Wir wollen hier gleich bemerken, daß man zwischen der Schnelligkeit der Reaktion einerseits und der Intensität derselben anderseits unterscheiden muß, Schnelligkeit und Intensität gehen nicht immer parallel. Häufig beobachtet man, daß ein Gewebsauszug die Reaktion anfangs nur wenig beschleunigt, dann aber eine intensive Färbung hervorruft, während ein anderer Extrakt die Färbung schneller hervorruft, sie aber weniger intensiv werden läßt. Es scheint, als ob manchmal im Anfange der Reaktion sich ein hemmender Einfluß bemerkbar mache, daß aber im weiteren Verlaufe der Reaktion die Oxydationswirkung überhandnehme.

In unseren Versuchen haben wir vor allen Dingen die Schnelligkeit der Färbung in Betracht gezogen. Dieselbe läßt sich leichter in exakter Weise bestimmen.

c) Oxydation der Jodwasserstoffsäure durch das Blut und die verschiedenen Tiergewebe in Gegenwart von Äthylhydroperoxyd.

Mit Hilfe der oben beschriebenen Methode haben wir die verschiedenen Gewebe sowie das Blut der verschiedenen höheren Tiere auf ihren

Gehalt an Peroxydase untersucht. Wir wollen hier nur einige typische Beispiele mitteilen. Die Resultate sind unbeständig. Man beobachtet sehr starke individuelle Verschiedenheiten, auf die wir später bei der Vergleichung der verschiedenen Gewebe in bezug auf ihren Gehalt an Peroxydase zurückkommen werden. Die Versuchstypen der Tabelle I sollen hauptsächlich die positive Reaktion der verschiedenen Gewebe sowie den Einfluß der Verdünnung der Gewebsauszüge auf die Reaktionsbeschleunigung illustrieren.

Tabelle I.

Einfluß der Verdünnung des Blutes oder der Gewebsextrakte auf die Geschwindigkeit der Bläuung des Stärkekleisters. In allen Versuchen wird zu je 2 ccm des Reaktivs 1 Tropfen des zu untersuchenden Gewebsextrakts hinzugefügt. Im Kontrollversuche (Reagens ohne Gewebsextrakt) tritt die Blaufärbung nach 9 bis 10 Min. ein.

Gewebe	Verdünnung	Reaktion
I. Blut von Rind . . .	1 Tropfen $^1/_{1000}$	Blaufärb. nach 1 Min.
„ „ „ . . .	1 „ $^1/_{5000}$	„ „ 2 „
„ „ „ . . .	1 „ $^1/_{10\,000}$	„ „ 3 „
„ „ „ . . .	1 „ $^1/_{25\,000}$	wie Kontrolle
II. „ „ Hund . . .	1 Tropfen unverdünnt	negativ
„ „ „ . . .	1 „ $^1/_{10}$	Blaufärb. nach 20 Sek.
„ „ „ . . .	1 „ $^1/_{100}$	„ „ 10 „
„ „ „ . . .	1 „ $^1/_{1000}$	„ „ 1 Min.
„ „ „ . . .	1 „ $^1/_{10\,000}$	„ „ 4 „
„ „ „ . . .	1 „ $^1/_{30\,000}$	wie Kontrolle
III. „ „ Kaninchen .	1 Tropfen $^1/_{30}$	Blaufärb. nach 45 Sek.
„ „ „ .	1 „ $^1/_{100}$	„ „ 75 „
„ „ „ .	1 „ $^1/_{700}$	„ „ 2 Min.
„ „ „ .	1 „ $^1/_{2000}$	„ „ 3 „
„ „ „ .	1 „ $^1/_{7000}$	„ „ 5 „
„ „ „ .	1 „ $^1/_{20\,000}$	wie Kontrolle
IV. Hämoglobin v. Ratte	1 „ $^1/_{1000}$	Blaufärb. nach 20 Sek.
„ „ „	1 „ $^1/_{10\,000}$	„ „ 45 „
„ „ „	1 „ $^1/_{20\,000}$	„ „ $1\,^1/_2$ Min.
„ „ „	1 „ $^1/_{50\,000}$	„ „ 2 „
„ „ „	1 „ $^1/_{100\,000}$	„ „ 3 „
„ „ „	1 „ $^1/_{200\,000}$	wie Kontrolle
V. Lymphdrüse v. Rind	1 „ $^1/_{50}$	Blaufärb. nach 2 Min.
„ „ „	1 „ $^1/_{250}$	„ „ $2\,^1/_2$ „
„ „ „	1 „ $^1/_{1000}$	„ „ 3 „
„ „ „	1 „ $^1/_{10\,000}$	„ „ 4 „
„ „ „	1 „ $^1/_{50\,000}$	„ „ 6 „
„ „ „	1 „ $^1/_{100\,000}$	wie Kontrolle

Gewebe	Verdünnung	Reaktion
VI. Leber von Kaninchen	1 Tropfen $^1/_{50}$	Blaufärb. nach 2 Min.
„ „ „	1 „ $^1/_{150}$	„ „ $2^1/_2$ „
„ „ „	1 „ $^1/_{500}$	„ „ $2^1/_2$ „
„ „ „	1 „ $^1/_{2000}$	„ „ $4^1/_2$ „
„ „ „	1 „ $^1/_{5000}$	„ „ $4^1/_2$ „
„ „ „	1 „ $^1/_{15000}$	wie Kontrolle
VII. „ „ Hammel	1 „ $^1/_3$	negativ (Verzögerung der Reaktion)
„ „ „	1 „ $^1/_{10}$	Blaufärb. nach 4 Min.
„ „ „	1 „ $^1/_{30}$	„ „ 3 „
„ „ „	1 „ $^1/_{100}$	„ „ 2 „
„ „ „	1 „ $^1/_{300}$	„ „ $1^1/_2$ „
„ „ „	1 „ $^1/_{1000}$	„ „ 2 „
„ „ „	1 „ $^1/_{3000}$	„ „ 3 „
„ „ „	1 „ $^1/_{10000}$	wie Kontrolle
VIII. Milz „ „	1 „ $^1/_{20}$	Blaufärb. nach 45 Sek.
„ „ „	1 „ $^1/_{50}$	„ „ 30 „
„ „ „	1 „ $^1/_{200}$	„ „ 45 „
„ „ „	1 „ $^1/_{500}$	„ „ 80 „
„ „ „	1 „ $^1/_{2000}$	„ „ 100 „
„ „ „	1 „ $^1/_{5000}$	„ „ 3 Min.
„ „ „	1 „ $^1/_{20000}$	undeutlich
IX. Lunge von Pferd .	1 „ $^1/_5$	Blaufärb. nach 4 „
„ „ „ .	1 „ $^1/_{10}$	„ „ 1 „
„ „ „ .	1 „ $^1/_{50}$	„ „ $1^1/_2$ „
„ „ „ .	1 „ $^1/_{250}$	„ „ 2 „
„ „ „ .	1 „ $^1/_{500}$	„ „ 3 „
„ „ „ .	1 „ $^1/_{2500}$	„ „ 5 „
„ „ „ .	1 „ $^1/_{10000}$	undeutlich
X. Niere „ „ .	1 „ $^1/_{10}$	Blaufärb. nach 3 Min.
„ „ „ .	1 „ $^1/_{20}$	„ „ 2 „
„ „ „ .	1 „ $^1/_{100}$	„ „ 1 „
„ „ „ .	1 „ $^1/_{200}$	„ „ $1^1/_2$ „
„ „ „ .	1 „ $^1/_{700}$	„ „ $2^1/_2$ „
„ „ „ .	1 „ $^1/_{2000}$	„ „ 3 „
„ „ „ .	1 „ $^1/_{7000}$	„ „ 5 „
„ „ „ .	1 „ $^1/_{20000}$	undeutlich
XI. Muskel „ „ .	1 „ $^1/_{10}$	Blaufärb. nach 20 Sek.
„ „ „ .	1 „ $^1/_{20}$	„ „ 30 „
„ „ „ .	1 „ $^1/_{100}$	„ „ 45 „
„ „ „ .	1 „ $^1/_{200}$	„ „ 1 Min.
„ „ „ .	1 „ $^1/_{1000}$	„ „ $2^1/_2$ „
„ „ „ .	1 „ $^1/_{2000}$	„ „ $3^1/_2$ „

Gewebe	Verdünnung	Reaktion
XII. Thyroidea v. Pferd	1 Tropfen 1/10	Blaufärb. nach 1 Min.
„ „ „	1 „ 1/20	„ „ 1 „
„ „ „	1 „ 1/100	„ „ 1 1/2 „
„ „ „	1 „ 1/200	„ „ 1 1/2 „
„ „ „	1 „ 1/1000	„ „ 2 1/2 „
„ „ „	1 „ 1/2000	„ „ 3 „
XIII. Thymus von Schaf	1 „ 1/20	negativ (starke Verzögerung)
„ „ „	1 „ 1/50	negativ (starke Verzögerung)
„ „ „	1 „ 1/200	undeutlich
„ „ „	1 „ 1/500	„
„ „ „	1 „ 1/2000	Blaufärb. nach 6 Min.
„ „ „	1 „ 1/5000	„ „ 2 „

Aus den Versuchen der Tabelle I geht hervor, daß alle darauf untersuchten Gewebe größtenteils in sehr deutlicher Weise die Oxydation der Jodwasserstoffsäure in Gegenwart von Äthylhydroperoxyd beschleunigen. Man erhält zwar manchmal auch negative Resultate, d. h. manche Gewebsextrakte rufen keine Beschleunigung der Oxydation hervor, in welcher Verdünnung man sie auch anwende. Diese negativen Resultate werden wir weiter unten in der Tabelle II mitteilen. In einigen Fällen kann man deutlich den hemmenden Einfluß der jodbindenden Substanzen wahrnehmen. Einige Gewebsauszüge rufen die Blaufärbung später hervor, wenn sie nur wenig verdünnt sind, während sie bei stärkerer Verdünnung das Reagens sehr schnell färben. In anderen Fällen jedoch ist die Oxydationswirkung die vorherrschende, und die Bläuung tritt um so schneller auf, je stärker die Konzentration des gegebenen Extraktes ist.

Das Blut sowie das krystallisierte Hämoglobin beschleunigen energisch die Oxydation der Jodwasserstoffsäure in Gegenwart von Äthylhydroperoxyd. Anderseits haben v. Czyhlarz und v. Fürth[1]) gezeigt, daß Hämoglobin keine Bläuung der Jodstärke in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd hervorruft. Wir sind im unklaren, welchem Umstande das verschiedene Verhalten des Hämoglobins den beiden Peroxyden gegenüber zuzuschreiben sei. Übrigens kann man hier, ebensowenig wie in vielen anderen Fällen, wo die Reaktion negativ ausfällt, mit Bestimmtheit behaupten, daß die Oxydation der Jodwasser-

[1]) l. c.

stoffsäure durch das Wasserstoffsuperoxyd + Hämoglobin nicht zustande gekommen sei. Das Ausbleiben der Blaufärbung könnte auch darauf zurückgeführt werden, daß unter der Einwirkung des Wasserstoffsuperoxyds aus dem Hämoglobin sich Körper gebildet haben, die das freiwerdende Jod binden und auf diese Weise die Blaufärbung des Stärkekleisters verhindern.

d) Bestimmung des Oxydationsvermögens der verschiedenen Tiergewebe.

Wir haben versucht, die Menge der oxydierenden Substanz in den verschiedenen Geweben zu messen. Zu dem Zwecke haben wir eine willkürliche Einheit des Oxydationsvermögens gegenüber Jodwasserstoffsäure in Gegenwart von Äthylhydroperoxyd gewählt. Diese Einheit, die wir Peroxydaseeinheit nennen, bezeichnet das Oxydationsvermögen eines Gewebes, das, höchstens mit seinem 10fachen Volumen Wasser vermischt, die Oxydation der Jodwasserstoffsäure durch das Äthylhydroperoxyd beschleunigt, wenn man einen Tropfen dieses Auszuges zum Reaktionsgemisch (2 ccm Jodstärkelösung + Äthylhydroperoxyd) hinzufügt.

Dasselbe Gewebe müßte, wenn es mit seinem 11fachen Volumen Wasser vermischt wird, völlig wirkungslos sein, wenn ein Tropfen dieses Auszuges der Reaktionsflüssigkeit beigemengt wird. Demnach würde ein Gewebe 10 Peroxydaseeinheiten besitzen, wenn es, höchstens mit seinem 100fachen Volumen Wasser versetzt, bei sonst gleicher Versuchsanordnung noch die Fähigkeit besitzen würde, die Bläuung des Stärkekleisters zu beschleunigen. Die Zahl dieser Einheiten bezeichnen wir kurz als Peroxydasezahl.

Wie wir bereits bemerkt haben, besitzt das Hämoglobin ein sehr hohes Oxydationsvermögen gegenüber Jodwasserstoffsäure in Gegenwart von Äthylhydroperoxyd — und, da anderseits die verschiedenen Gewebe mehr oder minder große Mengen Blut enthalten, so müßte man, um in einem Gewebe den Gehalt an echter Peroxydase bestimmen zu können, die Oxydationswirkung des in dem Gewebe enthaltenen Hämoglobins von dem totalen Oxydationsvermögen des untersuchten Gewebes in Abzug bringen. Wir haben es jedoch unterlassen. Wenn es sich übrigens um Laboratoriumstiere handelt, kann man die Organe von dem größten Teil des darin enthaltenen Blutes durch Entbluten und darauffolgendes sorgfältiges Durchspülen mit physiologischer Kochsalzlösung befreien.

In der Tabelle II teilen wir die quantitativen Resultate mit, die wir in der soeben beschriebenen Weise erhalten haben. In einigen Fällen haben wir keine Beschleunigung der Reaktion wahrnehmen können, wie stark die Verdünnung des Extraktes auch war. Diese Resultate bezeichnen wir in der Tabelle mit negativ.

Tabelle II.

Peroxydasezahl der verschiedenen Gewebsauszüge und des Blutes.

Versuchsanordnung wie früher.

Gewebe	Verdünnungsgrenze	Zahl der Peroxydase-einheiten
Lymphdrüse von Rind	1 Tropfen $^1/_{10\,000}$	1000
„ „ „	1 „ $^1/_{50\,000}$	5000
„ „ „	1 „ $^1/_{50\,000}$	5000
„ „ „	—	0 (negativ)
„ „ Hund . . .	1 „ $^1/_{1000}$	100
„ „ Kaninchen .	1 „ $^1/_{50\,000}$	5000
„ „ Hammel . .	1 „ $^1/_{150}$	15
„ „ Pferd . . .	1 „ $^1/_{50\,000}$	5000
„ „ „ . . .	1 „ $^1/_{1000}$	100
„ „ „ . . .	—	0 (negativ)
„ „ „ . . .	—	0 (negativ)
Leber von Pferd	1 „ $^1/_{1000}$	100
„ „ „	1 „ $^1/_{20\,000}$	2000
„ „ „	1 „ $^1/_{10\,000}$	1000
„ „ „	1 „ $^1/_{1000}$	100
„ „ Rind	1 „ $^1/_{2500}$	250
„ „ „	1 „ $^1/_{3000}$	300
„ „ Hammel	1 „ $^1/_{10\,000}$	1000
„ „ „	1 „ $^1/_{5000}$	500
„ „ Kaninchen	1 „ $^1/_{30\,000}$	3000
„ „ „	1 „ $^1/_{2500}$	250
„ „ Hund	—	0 (negativ)
„ „ „	1 „ $^1/_{100\,000}$	10000
Niere von Pferd	1 „ $^1/_{5000}$	500
„ „ Kaninchen	1 „ $^1/_{2000}$	200
Muskel von Rind	1 „ $^1/_{25\,000}$	2500
„ „ Pferd	1 „ $^1/_{20\,000}$	2000
„ „ Kaninchen	—	0 (negativ)
„ „ Meerschweinchen .	—	0 (negativ)
„ „ Taube	—	0 (negativ)
Pankreas von Pferd	—	0 (negativ)
Gehirn von Hammel	—	0 (negativ)
Thyroidea von Pferd	1 Tropfen $^1/_{2000}$	200
Thymus von Hammel	1 „ $^1/_{5000}$	500
„ „ „	—	0 (negativ)

Gewebe	Verdünnungsgrenze	Zahl der Peroxydaseeinheiten
Milz von Pferd	1 „ 1/20 000	2000
„ „ „	1 „ 1/10 000	1000
„ „ Hammel	1 „ 1/5000	500
Lunge von Pferd	1 „ 1/10 000	1000
„ „ „	1 „ 1/100 000	10000
„ „ „	1 „ 1/12 500	1250
„ „ Rind	1 „ 1/5000	500
„ „ Kaninchen	1 „ 1/4000	400
Blut von Rind	1 „ 1/25 000	2500
„ „ Hund	1 „ 1/30 000	3000
„ „ Kaninchen	1 „ 1/7000	700
„ „ Ratte	1 „ 1/50 000	5000
Gewaschene Blutkörperchen von Rind . . .	1 „ 1/25 000	2500
„ „ „ Pferd . .	1 „ 1/100 000	10000
„ „ „ „ . .	1 „ 1/25 000	2500
„ „ „ Hund . .	1 „ 1/1000	100
„ „ „ Kaninchen	1 „ 1/2000	200
Hämoglobin (krystallisiert) von Ratte	1 „ 1/100 000	10000

Die Resultate, die wir in Tabelle II gruppiert haben, beweisen zur Genüge, daß die Reaktion der Gewebe auf Jodwasserstoff in Gegenwart eines Peroxyds sehr unbeständig ist. v. Czyhlarz und v. Fürth hatten bereits diese Unregelmäßigkeit in der Oxydation der Jodwasserstoffsäure durch lymphoide Gewebe bemerkt. Wir können diese Unregelmäßigkeit auf alle anderen Gewebe ausdehnen. Ein Organ, das noch in äußerst starker Verdünnung wirksam ist, kann oft, wenn es einem anderen Individuum derselben Gattung entnommen wird, eine negative Reaktion geben, wie stark die Konzentration des Gewebsauszuges sei. Zwischen diesen Extremen finden wir allerlei Zwischenstufen. Wir gelangen also zur Schlußfolgerung, daß die Reaktion der Jodstärke nicht zu quantitativen Studien benutzt werden kann. Selbst rein qualitative Paroxydasebestimmungen eines Gewebes mit Hilfe dieser Reaktion sind unsicher. Wie es bereits v. Czyhlarz und v. Fürth beobachtet hatten, ist ein negatives Resultat kein definitiver Beweis dafür, daß in dem daraufhin untersuchten Gewebe sich keine Peroxydase vorfindet.

Das Blut mehrerer Tiere sowie das krystallisierte Hämoglobin der Ratte wirken in äußerst kleinen Dosen beschleunigend auf die Oxydation der Jodwasserstoffsäure durch das Äthylhydroperoxyd. Aber sehr oft ist das Oxydationsvermögen des Blutes, so wie wir es durch die Jod-

säurereaktion bestimmen konnten, bedeutend kleiner als das einiger Gewebe. In diesen Fällen kann die Jodstärkereaktion dazu dienen, das Vorhandensein einer echten Peroxydase in den Geweben, wie Leber, Lunge, Lymphdrüsen u. a., unabhängig von dem Hämoglobin des darin enthaltenen Blutes anzudeuten.

Bei der großen Unbeständigkeit der von uns angewandten Reaktion ist es unmöglich, eine exakte Klassifikation der verschiedenen Gewebe in bezug auf ihren Peroxydasereichtum aufzustellen.

Die Versuche, deren Resultat von oben mitgeteilt, sind mit frischen, bald nach dem Tode der Tiere entnommenen Geweben angestellt.

Wir haben eine Reihe von Versuchen gemacht, um zu prüfen, ob die Gewebe längere Zeit nach dem Tode ihre Oxydationswirkung auf Jodwasserstoffsäure beibehalten. Wir haben gefunden, daß die Gewebe, wenn sie bei niedriger Temperatur im Eisschranke aufbewahrt sind, nach 24 bis 48 Stunden dieselbe Oxydationsfähigkeit besitzen wie gleich nach dem Tode. Wenn die Gewebe bei Zimmertemperatur (18 bis 20° C) aufbewahrt werden, sind die Resultate verschieden. In einigen Fällen haben wir während 24 bis 48 Stunden keine deutliche Verminderung der Peroxydasewirkung beobachten können; in einigen anderen Fällen hingegen wird die Reaktion bereits nach 6 bis 7 Stunden negativ. Die Bläuung des Stärkekleisters wird durch Hinzufügen des Gewebsauszuges nicht beschleunigt, vielmehr oft verzögert.

Das Verschwinden, resp. die Verminderung der positiven Reaktion haben wir in mehreren Geweben, insbesondere in der Leber, der Niere und den Lymphdrüsen beobachtet. Das Verschwinden der deutlichen Oxydationswirkung einige Stunden nach dem Tode in den daraufhin von uns untersuchten Geweben könnte durch verschiedene Faktoren bedingt sein. Man kann vor allen Dingen an eine Zerstörung der Peroxydase denken. Jedoch scheint uns diese Annahme nicht sehr wahrscheinlich, da, wie wir später sehen werden, die Peroxydase, die die Ameisensäure oxydiert, sich sehr gut unter denselben Bedingungen konserviert. Man könnte vielmehr annehmen, daß infolge der Autolyse in den Geweben Körper entstehen, die die Bläuung des Stärkekleisters verhindern, indem sie das freiwerdende Jod binden, sei es, daß sie in einer anderen Weise wirken. Diese letztere Annahme scheint uns die wahrscheinlichere zu sein, doch haben wir diese Frage nicht eingehender studiert.

e) Widerstand der Peroxydase und des Hämoglobins gegen die Einwirkung höherer Temperatur sowie der Säuren und Alkalien.

v. Czyhlarz und v. Fürth[1]) haben bemerkt, daß gekochter Eiter die Oxydation der Jodwasserstoffsäure in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd nicht beschleunigt. Die Oxydation der Guajaconsäure, der

[1]) loc. cit.

Pyrogallussäure und anderer ähnlicher aromatischer Substanzen durch Eiter in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd wird nach Linossier[1]) durch Erhitzen, selbst durch anhaltendes Kochen des Eiters nicht völlig aufgehoben. Moitessier[2]) findet hingegen, daß die Peroxydasewirkung der Leukocyten auf Guajactinktur durch Siedehitze vernichtet wird, und stützt sich auf diese Beobachtung, um die fermentative Natur dieser Reaktion anzunehmen. Die guajacbläuende Eigenschaft des Blutes in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd erleidet nach Moitessier keine bedeutende Verminderung durch Erhitzen — selbst auf Siedetemperatur. Aus diesem verschiedenen Verhalten des Blutes und des Eiters gegenüber der Temperatureinwirkung schließt Moitessier, daß die peroxydaseartige Wirkung des Blutes keinem Fermente, sondern dem Hämoglobin zuzuschreiben sei.

Ähnliche Beobachtungen, betreffend die Hitzebeständigkeit des Blutes in bezug auf die peroxydaseartige Wirkung desselben auf die verschiedenen aromatischen Substanzen in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd, sind von mehreren anderen Autoren gemacht worden und haben zur Annahme geführt, daß die Oxydationswirkung des Blutes oder des Hämoglobins von der Wirkung der echten Peroxydasen unterschieden werden müsse (Pighini[3]), Senter[4]), Buckmaster[5]) u. a.).

Wir haben in einer Reihe von Versuchen festzustellen gesucht, bei welcher minimalen Temperatur die Peroxydase der verschiedenen Tiergewebe zerstört bzw. stark herabgesetzt wird. Versuche in derselben Richtung sind auch mit Hämoglobinlösung angestellt worden.

Zu dem Zweck wurde 1 Teil des zu untersuchenden, fein zerriebenen Gewebes oder des Blutes mit 50 Teilen Wasser versetzt, in ein Wasserbad von bestimmter konstanter Temperatur gebracht und, nachdem das Ganze die gewünschte Temperatur erreicht, 20 Minuten lang unter wiederholtem Umrühren im Wasserbade gelassen.

In der Tabelle III bringen wir einige Versuchstypen.

Tabelle III.

Widerstand der Peroxydase und des Hämoglobins gegen höhere Temperaturen.

Die in der Tabelle angegebenen, sich auf die Temperatur beziehenden Zahlen bezeichnen den bei dem Erhitzen der Peroxydase erreichten Wärmegrad. — Die Versuchsanordnung ist dieselbe wie in den vorhergehenden früher oben mitgeteilten Versuchen.

---

[1]) loc. cit.

[2]) loc. cit.

[3]) G. Pighini, Sulla reazione de guaiaco data dal sangue. Archivio di fisiologia 4, 67, 1906.

[4]) G. Senter, Some experiments on the guaiacum reaction of blood. Proc. Roy. Soc. (Nov. 1907); The Journ. of Physiol. 36.

[5]) loc. cit.

Gewebe	Temperatur	Verdünnung	Reaktion
Milz von Hammel . . .	—	1 Tropfen $^1/_{1000}$	Blaufärbung nach $2^1/_2$ Min.
„ „ „ . . .	60° C	„	„ nach 2 Min.
„ „ „ . . .	70° C	„	negativ
Leber von Pferd	—	1 Tropfen $^1/_{50}$	Blaufärbung nach $2^1/_2$ Min.
„ „ „	60° C	„	idem
„ „ „	70° C	„	negativ
„ „ „	—	„	Blaufärbung nach $4^1/_2$ Min.
„ „ „	55—60° C	„	„ 3 Min.
„ „ „	70° C	„	negativ (verzögernd)
Lymphdrüse von Rind .	—	1 Tropfen $^1/_{1000}$	Blaufärbung nach 3 Min.
„ „ „ .	75° C	„	negativ (Verzögerung der Reaktion
Lymphdrüse von Hund .	—	1 Tropfen $^1/_{50}$	Blaufärbung nach 2 Min.
„ „ „ .	75° C	„	negativ (Verzögerung der Reaktion)
Blut von Rind	—	1 Tropfen $^1/_{10000}$	Blaufärbung nach 3 Min.
„ „ „	70° C	„	„ nach 6 Min.
„ „ „	95° C	„	negativ
Blut von Kaninchen . .	—	1 Tropfen $^1/_{100}$	Blaufärbung nach 1 Min.
„ „ „ . .	70° C	„	negativ (Verzögerung der Reaktion)
Blutkörperchen von Pferd	70° C	1 Tropfen $^1/_{500}$	Blaufärbung nach 30 Sek.
„ „ „	70° C	„	schwach
„ „ „	95° C	„	idem

Die Resultate, die wir in der Tabelle III angeführt haben, beweisen, daß die Peroxydase der verschiedenen Gewebe einer Erhitzung auf 60 bis 65° C widerstehen, während sie bei 70° C vernichtet wird. Wir werden später sehen, daß die Peroxydase, die die Ameisensäure oxydiert, sich ebenso verhält.

Das Hämoglobin scheint etwas widerstandsfähiger gegen die Einwirkung höherer Temperaturen zu sein, insofern es die Oxydationswirkung auf Jodwasserstoffsäure betrifft. Wir haben in der Tat in einigen Fällen beobachtet, daß ein Erwärmen auf 70° C die Oxydationswirkung des Hämoglobins gegenüber Jodwasserstoffsäure in Gegenwart von Äthylhydroperoxyd nicht ganz aufhebt. Mitunter erhält man eine positive Reaktion selbst nach einem Erwärmen auf 95°. Letzteres ist allerdings selten. In dem größten Teil der Fälle verliert das Hämoglobin durch Erhitzen auf 70° ganz oder teilweise seine die Oxydation der Jodwasserstoffsäure in Gegenwart von Äthylhydroperoxyd beschleunigende Wirkung.

Wir haben auch die Einwirkung der Säuren und Alkalien auf das Oxydationsvermögen der verschiedenen Gewebe und des Hämoglobins untersucht. Zu dem Zwecke fügt man zu 1 Teile des zu untersuchenden Gewebes oder des Hämoglobins, resp. des Blutes, 50 ccm einer Säure- oder Alkalilösung und läßt das Ganze 15 Minuten lang im Thermostaten bei 40° C. stehen. Man neutralisiert dann sorgfältig und prüft das Oxydationsvermögen wie gewöhnlich. Die Versuche, die wir in der soeben beschriebenen Weise ausgeführt haben, haben folgendes ergeben: Die Chlorwasserstoffsäure in einer Konzentration von 1 : 2000 vernichtet das Oxydationsvermögen der Gewebe gegenüber Jodwasserstoffsäure. Die Natronauge in einer Konzentration von 1 : 1000 bleibt ohne jede Wirkung oder übt vielmehr einen günstigen Einfluß auf das Oxydationsvermögen der Gewebe aus. Wir können also daraus schließen, daß die Peroxydase durch verdünnte Alkalilösungen nicht beeinträchtigt wird. Wir können aber nicht mit Bestimmtheit behaupten, daß dieselbe durch Einwirken von verdünnter Säure vernichtet sei, denn auch hier könnte die negative Reaktion, d. h. das Ausbleiben der Blaufärbung der Jodstärke durch andere Faktoren bedingt sein. Man könnte annehmen, daß unter dem Einfluß der Säure im Gewebsauszuge sich Substanzen gebildet haben, die die Reaktion in einer oder der anderen Weise hemmen.

Auf das Hämoglobin wirken die Säuren und Alkalien in ungefähr derselben Weise wie auf die Gewebe ein. Doch zeigt sich der Blutfarbstoff im allgemeinen gegen die Wirkung der Säuren weniger empfindlich. In einer Verdünnung von 1 : 2000 wirkt die Chlorwasserstoffsäure nur sehr schwach ein. In einer Verdünnung von 1 : 1000 ruft dieselbe eine Abschwächung des Oxydationsvermögens, aber keine völlige Zerstörung derselben hervor. Das Oxydationsvermögen des Hämoglobins gegenüber Jodwasserstoffsäure in Gegenwart von Äthylhydroperoxyd wird nur durch stärkere Säuregrade vernichtet.

II. Die Oxydation der Ameisensäure.

a) Einleitung.

Bekanntlich wird die Ameisensäure durch Wasserstoffsuperoxyd selbst bei Zimmertemperatur unter Bildung von Kohlensäure langsam oxydiert.

In neuerer Zeit ist diese Oxydation der Ameisensäure durch H_2O_2 von Dakin[1]) eingehend geprüft worden.

Wenn man eine Lösung von ameisensaurem Kalk oder Natron in einer Konzentration von 1 bis 6 : 100 mit 1 bis 2%igem Wasserstoffsuperoxyd versetzt und das Ganze im Wasserbade bei 40° C stehen läßt, so bemerkt man eine sehr langsame Kohlensäureentwicklung. Die Menge der innerhalb mehrerer Stunden gebildeten Kohlensäure ist unscheinbar. Bei saurer Reaktion geht die Kohlensäurebildung noch langsamer als im neutralen Medium vor sich. Die Oxydation der Ameisensäure durch 1%iges Wasserstoffsuperoxyd, die bei einer Temperatur von 60° C ziemlich stark ist, wird bei saurer Reaktion des Mediums kaum wahrnehmbar.

Versuche, die Ameisensäure durch Katalase (wässeriger Auszug der Leber) in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd zu Kohlensäure zu oxydieren, sind von Loevenhart und Kastle[2]) gemacht worden, haben aber ein negatives Resultat ergeben. Diesen Autoren ist es jedoch gelungen, die Ameisensäure sowie das Formaldehyd durch fein verteiltes Platin in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd zu oxydieren.

F. Battelli[3]) hatte bereits vor mehreren Jahren darauf hingewiesen, daß der Alkoholniederschlag der Leber und der Muskeln höherer Tiere die Fähigkeit besitzt, die Oxydation der Ameisensäure in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd sehr energisch zu beschleunigen. Er hatte auch gefunden, daß diese Fähigkeit durch Kochen des Alkoholniederschlags aufgehoben wird, und schloß daraus, daß die die Oxydation der Ameisensäure in Gegenwart von H_2O_2 beschleunigende Wirkung der Gewebe einem besonderen in den untersuchten Geweben enthaltenen Fermente zuzuschreiben sei.

In einer kurzen Mitteilung veröffentlichten Cervello und Pitini[4]) die Resultate, die sie bei der Oxydation der Aldehyde, namentlich des Formaldehyds durch die verschiedenen Tiergewebe in Gegenwart von H_2O_2 erhalten haben. Diese Forscher haben sich der Methode von Battelli bedient und haben eine sehr starke Kohlensäurebildung namentlich in den Versuchen mit Nierengewebe, das nach diesen Forschern ein bedeutend stärkeres Oxydationsvermögen als die anderen

[1]) H. D. Dakin, A comporative study of the oxydation of the ammonium salt of saturated fatty acids with hydrogen peroxyde. Journ. of Biolog. Chem. 4, 2 u. 3, 1908.

[2]) Loevenhart and Kastle, American chemical journal 29, 397, 1903. On the catalytic decomposition of hydrogen peroxide and the mechanism of induced oxidations together with a note on the nature and function of catalase.

[3]) F. Batelli, Oxydation de l'acide formique par les extraits des tissus animaux en présence de peroxyde d'hydrogène. Compt. rend. 138, 651, 1904.

[4]) Cervello et Pitini, Sull'ossidibalità delle aldeidie e specialmente della formica. Archivio di farmacol. e terapeut. 18, 1, 1907.

Gewebe besitzt, verzeichnet. Es ist ihnen auch gelungen, außer dem Formaldehyd das Propion-, das Valerian- und das Isobutylaldehyd zu oxydieren, doch geben sie die Mengen der dabei entstandenen Kohlensäure nicht an. Wir wollen hier gleich bemerken, daß in unseren Versuchen die Niere stets ein geringeres Oxydationsvermögen als die Leber besaß, im Gegensatz zu den Angaben der vorher genannten Forscher. Leider geben dieselben nicht näher an, welcher Tiergattung die von ihnen benutzten Gewebe entnommen waren, noch wie stark die Konzentration des verwandten Wasserstoffsuperoxyds war. Es ist also nicht ausgeschlossen, daß unsere Versuche nicht ganz unter denselben Bedingungen ausgeführt sind wie die von Cervello und Pitini.

Die Oxydation der Ameisensäure durch die verschiedenen Tiergewebe ist neulich in unserem Laboratorium von Fräulein Sarafoff[1]) wieder studiert worden. Die Resultate sind in ihrer Inauguraldissertation niedergelegt.

b) Vorversuche.

Die Methode besteht hauptsächlich in der Bestimmung der Kohlensäure, die bei der Einwirkung von fein zerriebenem Gewebe auf Ameisensäure in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd entsteht. Man kann zu dem Zwecke das frische Gewebe oder den Alkoholniederschlag desselben benutzen. Da, wo es sich um frisches Gewebe handelt, muß man zwei Arten von Faktoren, die die Resultate beeinträchtigen, im Auge haben. Erstens müssen wir mit der den Geweben eigentümlichen Atmung, die die Resultate der Oxydation der Ameisensäure maskieren, rechnen. Eine mehr oder minder große Menge CO_2 rührt von der Gewebsatmung und keineswegs von der Oxydation der Ameisensäure her.

Ein zweiter nicht minder wichtiger Umstand ist der, daß die Katalase das hinzugefügte Wasserstoffsuperoxyd augenblicklich zerstört und auf diese Weise seine oxydierende Wirkung ausschließt.

Der erste störende Faktor, d. h. die Atmung des Gewebes selbst, kann durch Behandeln mit Alkohol beseitigt werden. Der Alkoholniederschlag besitzt keine eigene Atmungstätigkeit mehr. Doch bleibt die Katalase in großer Menge im Alkoholniederschlage.

Wenn man zum Alkoholniederschlage einige Kubikzentimeter 1%igen Wasserstoffsuperoxyds hinzusetzt — bemerkt man eine sofortige totale Zersetzung des H_2O_2. Der Einfluß der Katalase ist also vorherrschend, und daher ist die Oxydation der Ameisensäure nur gering. Wir haben nach einem Verfahren gesucht, das uns die Möglichkeit gäbe, soweit wie möglich die Wirkung der Katalase aufzuheben, ohne dabei die Oxydationskraft der Gewebe zu vernichten.

Es hat sich herausgestellt, daß man zu dem Zweck zweierlei Methoden benutzen kann. Man kann erstens die Konzentration des ameisensauren Kalks oder Natrons steigern und dadurch die Wasserstoffsuperoxydzersetzung durch die im Gewebe enthaltene Katalase etwas

[1]) Mlle Sarafoff, Oxydation de l'acide formique par les différents tissus animaux en présence de H_2O_2. Thèse inaugurale. Genève 1908.

hemmen. Die Wasserstoffsuperoxydzersetzung durch die Leber wird in merkbarer Weise durch eine 6- bis 8%ige ameisensaure Salzlösung verzögert. Diese Methode hat jedoch den Nachteil, die spontane Oxydation der Ameisensäure durch H_2O_2 zu fördern und kann also zu irrtümlichen Resultaten führen. In den Fällen, wo das Oxydationsvermögen eines Gewebes schwach ist, könnte man die kleinen Mengen der gebildeten Kohlensäure einer spontanen Oxydation der Ameisensäure zuschreiben. Übrigens ist die Kohlensäurebildung viel geringer als bei Anwendung des zweiten Verfahrens, das wir weiter unten beschreiben werden. Diese zweite Methode, die den Zweck hatte, die Wirkung der Katalase auf H_2O_2 nach Möglichkeit zu verringern, besteht darin, daß man die Reaktion in saurem Medium sich vollziehen läßt. Der die Wasserstoffsuperoxydzersetzung durch Katalase verzögernde Einfluß der Säuren ist längst zur Genüge bekannt. Wir haben beobachtet, daß, wenn wir zu dem von uns angewandten Reaktionsgemenge, bestehend aus 30 g frischen Lebergewebes + 100 ccm einer 1%igen ameisensauren Natronlösung, etwas Salzsäure in einer Proportion von 3:1000 hinzufügten, die Wasserstoffsuperoxydzersetzung bedeutend gehemmt wurde.

Eine etwas stärkere Konzentration der Salzsäure — 5:1000 z. B. — setzt die H_2O_2-Zersetzung ganz bedeutend herab. Die Sauerstoffentwicklung wird äußerst langsam und hört bei einer Salzsäurekonzentration von 8:1000 fast vollständig auf. Wie wir aber sehen werden, hört bei diesen starken Säuregraden zugleich auch die Wirkung der Peroxydase auf die Ameisensäure auf.

Aus unseren Versuchen über den Einfluß der Säuren auf die Oxydationsgeschwindigkeit der Ameisensäure durch Tiergewebe in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd geht übrigens deutlich hervor, daß dieselbe bei saurer Reaktion des Mediums viel größer ist als bei neutraler Reaktion.

Außerdem bietet das saure Medium den Vorteil, daß dadurch die Atmung der frischen Tiergewebe ausgeschaltet wird, und daß man infolgedessen den Alkoholniederschlag durch die frischen Gewebe ersetzen kann, was in vielen Fällen die Arbeit vereinfacht. Alle diese Gründe haben uns veranlaßt, der Methode des sauren Mediums den Vorzug zu geben, und wir haben dieselbe in allen unseren Versuchen angewandt.

Vor allen Dingen hatten wir uns überzeugt, daß die von der präexistierenden freien Kohlensäure durch einen Luftstrom befreiten Gewebe im sauren Medium und in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd nur Spuren Kohlensäure bilden. Wir haben dasselbe Resultat unter Anwendung der Gewebe + ameisensaures Salz, aber ohne Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd erhalten. Zuletzt haben wir auch die Menge der durch Einwirken von Wasserstoffsuperoxyd auf Ameisensäure in saurem Medium und bei einer Temperatur von 40° gebildeten Kohlensäure zu bestimmen gesucht. Auch hier handelte es sich um äußerst geringe, nicht in Betracht zu ziehende Quantitäten, wenn man das ameisensaure Kalium oder Natron in einer Konzentration von nicht mehr als 6:100 anwendet. Um also eine starke Kohlensäurebildung zu erhalten, ist außer dem ameisensauren

Salz und dem Wasserstoffsuperoxyd auch die Gegenwart der Gewebe notwendig, wie es Battelli in seinen ersten Versuchen bereits bemerkt hatte.

c) Methode.

Die von uns angewandte Methode ist im Prinzip dieselbe, die Battelli bei seinen ersten Versuchen benutzt hat. Die hauptsächliche Abänderung besteht in der Anwendung eines sauren Reaktionsmediums. Man kann sich sowohl der frischen Gewebe als des Alkoholniederschlages derselben bedienen. Die Anwendung frischer Gewebe ist vorzuziehen, wenn es sich darum handelt, das Oxydationsvermögen der einzelnen Gewebe zu bestimmen. Dagegen benutzt man vorzugsweise den Alkoholniederschlag, wenn man eine Reihe untereinander zu vergleichender Versuche mit ein und demselben Gewebe anstellen will. Der Alkoholniederschlag hat den Vorzug, in seiner Zusammensetzung konstant zu bleiben.

Das fein zerkleinerte frische Gewebe oder der Alkoholniederschlag derselben wird in 100 ccm einer 1%igen ameisensauren Kalk- oder Natronlösung suspendiert. Das Ganze wird in einen ungefähr 2 Liter messenden Glaskolben gebracht und in ein Wasserbad bei konstanter Temperatur von 38 bis 40° getaucht. Man fügt die nötige Menge Salzsäure hinzu, um eine Gesamtkonzentration von 1:1000 zu erhalten und läßt einen von Kohlensäure befreiten Luftstrom durch das Reaktionsgemisch passieren, um die darin enthaltene präexistierende Kohlensäure auszutreiben. Man muß eine längere Einwirkung einer zu starken Säurelösung vermeiden, da das Oxydationsvermögen der Gewebe leicht darunter leiden kann. Nachdem das Reaktionsgemisch auf diese Weise von aller Kohlensäure befreit worden ist, setzt man von neuem die nötige Menge Salzsäure, um den günstigsten Säuregrad zu erhalten, hinzu und läßt alle 30 Sekunden 2 ccm einer 1%igen Wasserstoffsuperoxydlösung in dasselbe fließen. Die Gesamtmenge der in den meisten Versuchen angewandten Wasserstoffsuperoxydlösung betrug gewöhnlich 60 ccm, die innerhalb 15 Minuten dem Reaktionsgemisch zugefügt wurden. Nach weiteren 5 Minuten, während welcher der Ballon energisch geschüttelt wird, fügt man 5 ccm einer 10%igen Salzsäurelösung hinzu, um die während der Reaktion gebildete Kohlensäure in Freiheit zu setzen, und läßt einen von Kohlensäure befreiten Luftstrom durch das Reaktionsgemisch solange streichen, bis daß das Barytwasser durch denselben nicht mehr getrübt werde.

Die Menge der gebildeten Kohlensäure wird durch die Größe des kohlensauren Barytniederschlages bestimmt. Der Niederschlag des kohlensauren Bariums wird solange zentrifugiert, bis die Größe desselben konstant bleibt. Durch vorherige Versuche hatten wir gefunden, daß 1 ccm eines auf diese Weise erhaltenen Bariumcarbonatniederschlages 12 bis 13 ccm Kohlensäure entspricht.

Dieses soeben beschriebene Verfahren ist von einer sehr schnellen und leichten Ausführung. Durch Kontrollversuche hatten wir festgestellt, daß bei Anwendung desselben die Fehler nie mehr als 10% betragen.

In einigen Versuchen haben wir die totale Menge der HCl (welche dem Optimum des Säuregrades entsprach, mit einem Male hinzugefügt und dann das Wasserstoffsuperoxyd wie gewöhnlich je 2 ccm alle 30 Sekunden fallen gelassen. In dem Falle muß durch Kontrollversuche die Menge der im Reaktionsgemische präexistierenden Kohlensäure bestimmt und dieselbe von der totalen Kohlensäuremenge in Abzug gebracht werden. Übrigens beträgt die in den frischen Geweben enthaltene Kohlensäure nicht mehr als 1,5 bis 4 ccm pro 30 g frischen Gewebes.

Das Blut enthält dagegen größere Mengen Kohlensäure.

d) Optimum des Säuregrades bei Anwendung verschiedener Quantitäten der Gewebe.

Wir haben versucht, den für die Reaktion günstigsten Säuregrad bei Anwendung verschiedener frischer Gewebe sowie des Alkoholniederschlages der Leber zu bestimmen.

In der Tabelle IV teilen wir die Resultate einiger solcher Versuche mit.

Die zu untersuchenden frischen Gewebe oder der Alkolniederschlag der Leber werden in 100 ccm einer 1%igen ameisensauren Salzlösung, welche den in der Tabelle angegebenen Säuregrad besitzt, suspendiert. Man fügt alsdann alle 30 Sekunden 2 ccm einer 1%igen Wasserstoffsuperoxydlösung hinzu.

Tabelle IV.

Einfluß der Säurekonzentration auf die Oxydation der Ameisensäure durch die verschiedenen frischen Gewebe sowie durch den Alkoholniederschlag der Leber.

Gewebe	Gewicht	Salzsäurekonzentration	CO_2 in ccm
Alkoholniederschlag der Leber von Pferd	15 g	—	7
" " " "	15 "	1/2000	11
" " " "	15 "	1/1000	14
" " " "	15 "	2/1000	36
" " " "	15 "	4/1000	41
Alkoholniederschlag der Leber von Rind	15 "	2/1000	36,5
" " " "	15 "	4/1000	28
" " " "	15 "	6/1000	9
" " " "	15 "	8/1000	3
Frische Leber von Rind	30 "	2/1000	32
" " " "	30 "	3/1000	46
" " " "	30 "	4/1000	34
" " " "	10 "	1/1000	15
" " " "	10 "	1,5/1000	19

Gewebe	Gewicht	Salzsäure-konzentration	CO_2 in ccm
Frische Leber von Rind	10 g	$^{2}/_{1000}$	28
„ „ „ „	10 „	$^{3}/_{1000}$	9,5
Frische Milz von Rind	30 „	$^{1,5}/_{1000}$	7
„ „ „ „	30 „	$^{2}/_{1000}$	10
„ „ „ „	30 „	$^{3}/_{1000}$	10
„ „ „ Hammel	30 „	$^{1,5}/_{1000}$	5,5
„ „ „ „	30 „	$^{2}/_{1000}$	12
„ „ „ „	30 „	$^{3}/_{1000}$	9
Frische Niere von Pferd	30 g	$^{1}/_{1000}$	12,5
„ „ „ „	30 „	$^{2}/_{1000}$	19
„ „ „ „	30 „	$^{3}/_{1000}$	17
Frisches Gehirn von Hammel . . .	30 „	$^{1}/_{1000}$	5,5
„ „ „ „ . . .	30 „	$^{1,5}/_{1000}$	6
„ „ „ „ . . .	30 „	$^{2}/_{1000}$	6,5
„ „ „ „ . . .	30 „	$^{3}/_{1000}$	5,5
Frischer Pankreas von Pferd . . .	30 „	$^{1}/_{1000}$	4
„ „ „ „ . . .	30 „	$^{2}/_{1000}$	8
„ „ „ „ . . .	30 „	$^{3}/_{1000}$	6
Frische Lymphdrüsen von Hammel	30 „	$^{1}/_{1000}$	3
„ „ „ „	30 „	$^{2}/_{1000}$	6,5
„ „ „ „	30 „	$^{3}/_{1000}$	6
Frischer Hoden von Hammel . . .	30 „	$^{1}/_{1000}$	3
„ „ „ „ . . .	30 „	$^{2}/_{1000}$	5,5
„ „ „ „ . . .	30 „	$^{3}/_{1000}$	5,5

Aus den in Tabelle IV angeführten Resultaten geht hervor, daß die optimale Säurekonzentration bei Anwendung von 15 g Alkoholniederschlages der Leber oder von 30 g frischen Lebergewebes ungefähr $^{3}/_{1000}$ Salzsäure entspricht. Für 10 g frischer Leber ist das Optimum $^{2}/_{1000}$ Salzsäure und für die anderen frischen Gewebe $^{2,5}/_{1000}$ Salzsäure für 30 g und $^{1,5}/_{1000}$ für 10 g derselben. Die Leber verlangt einen etwas höheren Säuregrad als die übrigen Gewebe, weil sie eine größere Menge Katalase enthält.

e) Oxydationsvermögen der verschiedenen Tiergewebe.

Nach dem von uns beschriebenen Verfahren haben wir das Oxydationsvermögen der verschiedenen Tiergewebe untersucht.

Die Resultate unserer Versuche sind in Tabelle V niedergelegt.

Tabelle V.

Oxydation der Ameisensäure durch die verschiedenen Tiergewebe in Gegenwart von H_2O_2.

In allen hier angeführten Versuchen wurden 30 g frischen Gewebes + 100 ccm einer 1 %igen ameisensauren Calciumlösung + 60 ccm einer 1 %igen Wasserstoffsuperoxydlösung sowie eine gewisse Menge Salzsäure, deren Gesamtkonzentration in der Tabelle angegeben ist, verwandt.

Gewebe	Salzsäure-konzentration	CO_2 in ccm
Leber von Hammel	3 ‰	62
„ „ „	3 „	48
„ „ „	3 „	74
„ „ „	3 „	78
„ „ Rind	3 „	51
„ „ „	3 „	42
„ „ „	3 „	32
„ „ „	3 „	25
„ „ „	3 „	42
„ „ Pferd	3 „	40
„ „ „	3 „	30
„ „ Hund	3 „	22
„ „ „	3 „	24
„ „ „	3 „	30
„ „ „	3 „	35,2
„ „ Kaninchen	3 „	30
„ „ „	3 „	24
Blut von Rind	3 „	19
„ „ „	3 „	27,5
„ „ „	3 „	20
„ „ Kaninchen	3 „	19
„ „ „	3 „	26
„ „ Hund	3 „	15
„ „ „	3 „	15
„ „ „	3 „	29
„ „ Pferd	3 „	14
„ „ „	3 „	17
Niere von Pferd	3 „	23
„ „ „	3 „	19
„ „ „	2,5 „	18
„ „ „	2,5 „	16
„ „ „	2,5 „	27
„ „ Hund	2,5 „	17,5
„ „ „	2,5 „	12
„ „ „	2,5 „	18
„ „ „	2,5 „	16
„ „ „	2,5 „	12
Lunge von Pferd	3 „	11
„ „ „	3 „	8
„ „ „	3 „	9
„ „ „	3 „	12
„ „ Hund	2,5 „	5,5
„ „ „	2,5 „	7,5

Gewebe	Salzsäure-konzentration	CO_2 in ccm
Lunge von Hund	2,5 ‰	13
„ „ „	2,5 „	11
Muskel von Kaninchen	3 „	2
„ „ „	2,5 „	4
„ „ „	2,5 „	6,5
„ „ Hund	2,5 „	8
„ „ „	2,5 „	7
„ „ „	2,5 „	3,5
„ „ „	2,5 „	6,5
„ „ „	2,5 „	5,5
„ „ Rind	3 „	7,5
„ „ „	3 „	6
Pankreas von Pferd	2 „	8
„ „ „	2 „	13
„ „ „	2 „	11
Milz von Rind	2,5 „	10
„ „ „	2,5 „	16
„ „ Pferd	2,5 „	17
„ „ „	2,5 „	13
„ „ Hammel	2,5 „	11
„ „ „	2,5 „	14
Lymphdrüsen von Rind	2 „	7
„ „ „	2,5 „	10,5
„ „ „	2,5 „	12
Schilddrüse von Rind	2,5 „	4
„ „ „	2,5 „	3
Schilddrüse von Pferd	2,5 „	5,5
„ „ „	2,5 „	9
Gehirn von Hammel	2 „	5,75
„ „ „	2 „	8
„ „ Hund	2,5 „	3,5
„ „ „	2,5 „	7,5
„ „ „	2,5 „	6
„ „ „	2,5 „	6
Hoden von Hammel	3 „	5
„ „ „	2 „	7,5
„ „ „	2 „	6
Thymus von Hammel	2,5 „	7
„ „ „	2 „	5
Nebenniere von Rind (Marksubstanz)	2,5 „	6
Nebenniere von Rind (Rindesubstanz)	2,5 „	7

Gewebe	Salzsäurekonzentration	CO_2 in ccm
Nebenniere von Rind (Marksubstanz)	2,5 ‰	4
Nebenniere von Rind (Rindesubstanz)	2,5 „	8,5

Die Versuche, deren Resultate wir in der Tabelle V mitgeteilt, ergeben, daß zwischen Tieren derselben Gattung individuelle Verschieden heiten in bezug auf ihr Oxydationsvermögen gegenüber Ameisensäure existieren. Ein Gewebe, das derselben Tierart entstammt, besitzt nicht immer das gleiche Oxydationsvermögen, doch sind die Abweichungen im allgemeinen nicht sehr groß.

Wenn wir den Durchschnitt der in Tabelle V angegebenen Zahlen nehmen, erhalten wir folgende Resultate, die wir in der Tabelle VI gruppieren wollen.

Tabelle VI.

Durchschnittsmengen der Kohlensäure, die durch die Einwirkung der verschiedenen Gewebe auf Ameisensäure in Gegenwart von H_2O_2 gebildet wird.

Gewebe	CO_2 in ccm
Leber von Hammel	65,5
Leber von Rind	38,8
Leber von Pferd	35
Leber von Hund	27,9
Leber von Kaninchen	27
Blut von Rind.	22,2
Blut von Pferd	15,5
Blut von Hund.	20
Blut von Kaninchen	22,5
Niere von Pferd	20
Niere von Hund	15
Lunge von Pferd	10
Lunge von Hund	9,2
Muskel von Kaninchen.	4,2
Muskel von Hund.	6,1
Muskel von Rind	6,7
Pankreas von Pferd.	10,6
Milz von Rind	13
Milz von Pferd	13,7
Milz von Hammel	12,5
Lymphdrüsen von Rind	9,8

Gewebe	CO_2 in ccm
Schilddrüse von Rind	3,5
Schilddrüse von Pferd	7,5
Gehirn von Hammel	6,8
Gehirn von Hund	5,5
Hoden von Hammel	6,2
Thymus von Hammel	6
Nebenniere von Rind, Marksubstanz	5
Nebenniere von Rind, Rindesubstanz	7,8

Die in dieser Tabelle gruppierten Zahlen ergeben, daß unter den frischen Geweben die Leber die höchste Oxydationskraft besitzt. Die Hammelleber scheint energischer als die anderer Tiere zu wirken. Nächst der Leber besitzt das Blut das höchste Oxydationsvermögen. Wie wir später sehen werden, ist diese Oxydationswirkung dem im Blute enthaltenen Hämoglobin zuzuschreiben. Die Niere nimmt den dritten Platz ein. Darauf folgen in absteigender Reihenfolge die Milz, die Lunge, der Pankreas und die Lymphdrüsen. Die Wirkung der Milz und der Lunge kann vielleicht zum Teil dem in diesen Geweben enthaltenen Blut zugeschrieben werden. Die anderen Organe bedingen nur eine geringe Kohlensäurebildung. Die Zahl unserer Versuche ist für mehrere Gewebe nur sehr gering. Man müßte eine größere Anzahl besitzen, um sicherere Durchschnittszahlen angeben zu können.

Auf Grund unserer mitgeteilten Resultate können wir immerhin die Gewebe nach ihrem Oxydationsvermögen in folgender absteigender Reihenfolge ordnen: Leber, Blut, Niere, Milz, Lunge, Pankreas, Lymphdrüse, Rindmuskel, Gehirn, Hoden, Hundemuskel, Thymus, Nebenniere, Schilddrüse, Kaninchenmuskel.

f) Die Peroxydase im Alkoholniederschlage der Gewebe.

Außer den frischen Geweben haben wir den Alkoholniederschlag einiger derselben auf ihren Gehalt an Peroxydase untersucht. Die Alkoholniederschläge sind nach dem von Battelli früher bereits angegebenen Verfahren dargestellt. Die Gewebe werden mit Hilfe einer Hackmaschine fein zerrieben und mit dem 2fachen Volumen Alkohol 5 Minuten lang geschüttelt. Das Ganze wird durch Leinwand stark gepreßt und der Rückstand mit 2 Volumen Äther gewaschen, ausgepreßt und an der Luft getrocknet. Nach 24 Stunden ist der Rückstand recht trocken und zur Verwendung bereit. Nach demselben Verfahren haben wir auch Alkoholniederschläge des Blutes bereitet.

In der folgenden Tabelle teilen wir einige Resultate, die wir in den Versuchen mit diesen Alkoholniedersclägen erhalten haben, mit.

Tabelle VII.

Oxydation der Ameisensäure durch die Alkoholniederschläge der verschiedenen Tiergewebe in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd.

Die Versuchsanordnung ist dieselbe wie in den früheren Versuchen.

Alkoholniederschlag des Gewebes	Gewicht g	Salzsäurekonzentration ‰	CO_2 in ccm
Leber von Rind	21	3	60
„ „ „	15	3	57,5
„ „ „	13	2	36
„ „ „	18	3	47,5
„ „ „	5	3	27,5
Leber von Pferd	15	4	51
„ „ „	15	3	45
„ „ „	10	3	24,5
„ „ „	12	3	37,5
Blutkörperchen von Rind . . .	15	3	28,4
Blutkörperchen von Pferd . . .	15	3	18
Niere von Pferd	15	3	17
„ „ „	15	3	15
Muskel von Rind	15	1	4
Muskel von Pferd	15	2	3
Pankreas von Rind	15	3	3

Aus den in dieser Tabelle zusammengestellten Versuchsergebnissen ersieht man, daß die Alkoholniederschläge sowohl der roten Blutkörperchen als der verschiedenen Organe noch ein bedeutendes Oxydaionsvermögen aufweisen. Wie zu erwarten war, sind es die an Peroxydase reichen Gewebe, wie die Leber und die Niere, die die wirksamsten Alkoholniederschläge liefern. Wir werden also vorzugsweise den Alkoholniederschlag der Leber wählen, wenn es sich darum handeln wird, ein konstantes, aktives Präparat zur Ausführung einer Reihe untereinander zu vergleichender Versuche anzuwenden.

Wir haben außerdem einige Versuche gemacht, um das Oxydationsvermögen des frischen Lebergewebes mit dem des entsprechenden Alkoholniederschlages zu vergleichen. Im Durchschnitt liefern 30 g frischen Lebergewebes ungefähr 9 g Alkoholniederschlag. Wir bringen in der folgenden Tabelle einige dieser Versuchsergebnisse.

Tabelle VIII.

Vergleichende Untersuchung des Oxydationsvermögens frischer Gewebe und des entsprechenden Alkoholniederschlages.

Versuchsanordnung wie früher.

Gewebe	Gewicht g	Salzsäurekonzentration ‰	CO_2 in ccm
Frische Leber von Rind	30	3	45,5
Alkoholniederschlag	9	3	37,5
Frische Leber von Rind	10	1,5	21
Alkoholniederschlag	3	1,5	14
Frische Leber von Rind	20	3	36
Alkoholniederschlag	6	3	33,5
Rote Blutkörperchen von Rind	30	3	27,5
Alkoholniederschlag	15	3	24,5

Die in der letzten Tabelle angeführten Versuchsergebnisse lassen den Schluß zu, daß durch Behandeln mit Alkohol das Oxydationsvermögen der Gewebe nur wenig vermindert wird. Der Verlust beträgt in der Mehrzahl der Fälle nicht mehr als ein Drittel des Gesamtoxydationsvermögens des frischen Gewebes.

Die Versuche, die Peroxydase durch wiederholte Fällung mit Alkohol zu reinigen, haben keine befriedigende Resultate ergeben. Die zweite Alkoholfällung besitzt eine verhältnismäßig schwache Oxydationswirkung, ist hingegen sehr reich an Katalase. Letzteres war zu erwarten, da wir seiner Zeit dieses Verfahren zur Bereitung der äußerst aktiven Hepatokatalase angewandt hatten.[1])

g) Die Konservierung der Peroxydase in den Tiergeweben nach dem Tode.

Wir haben den Einfluß der nach dem Tode des Tieres verflossenen Zeit auf das Oxydationsvermögen der Gewebe studiert.

Wir haben zu dem Zweck vor allem die Leber und die Milz geprüft. Das Gewebe wurde so bald wie möglich nach dem Tode des Tieres genommen. Ein Teil wurde sofort auf sein Oxydationsvermögen untersucht. Ein anderer Teil wurde bei ungefähr 15° C verschieden lange Zeit aufbewahrt, worauf von neuem sein Oxydationsvermögen geprüft wurde.

In der folgenden Tabelle bringen wir die Ergebnisse einiger Versuchstypen.

---

[1]) F. Battelli und Mlle L. Stern, Recherches sur la catalase dans l'organisme animal. Arch. di Fisiol. 2, fasc. IV, 471 bis 509, 1905.

Tabelle IX.

Einfluß der nach dem Tode des Tieres verflossenen Zeit auf das Oxydationsvermögen der Gewebe.

Versuchsanordnung wie oben.

Gewebe	Gewicht	Zeit nach dem Tode	CO_2 in ccm
Leber von Rind	30 g	1 Stunde	56,7
„ „ „	30 „	24 Stunden	53,3
„ „ „	30 „	$1^1/_2$ Stunde	37,5
„ „ „	30 „	3 Tage	41
Milz „ „	30 „	$1^1/_2$ Stunde	10
„ „ „	30 „	24 Stunden	9

Diese soeben angeführten Versuchsergebnisse scheinen darzutun, daß die Gewebe längere Zeit nach dem Tode des Tieres ihre Oxydationswirkung auf Ameisensäure in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd intakt beibehalten. Man kann folglich zu den verschiedenen Versuchszwecken auch älteres Gewebe verwenden.

h) Einfluß der Temperatur auf die Oxydation der Ameisensäure durch die verschiedenen Gewebe und das Blut.

Wir haben in einer Reihe von Versuchen den Einfluß der verschiedenen Temperaturen auf die Oxydationsgeschwindigkeit der Ameisensäure durch die Gewebe einerseits und das Blut anderseits geprüft.

Die Resultate dieser Versuche teilen wir in untenstehender Tabelle mit.

Tabelle X.

Einfluß der Temperatur auf die Intensität der Oxydation der Ameisensäure.

Die Versuchsanordnung ist wie oben. In allen Versuchen beträgt die Salzsäurekonzentration $3^0/_{00}$.

Gewebe	Gewicht	Temperatur in Zentigraden	CO_2 in ccm
Frische Leber von Hammel	30 g	0^0	8,25
„ „ „ „	30 „	10^0	12
„ „ „ „	30 „	20^0	18
„ „ „ „	30 „	30^0	46,5
„ „ „ „	30 „	35^0	57
„ „ „ „	30 „	40^0	58,5
„ „ „ „	30 „	45^0	52,5

Gewebe	Gewicht	Temperatur in Centigraden	CO_2 in ccm
" " " "	30 g	50°	44,5
" " " "	30 "	55°	25,5
" " " "	30 "	60°	10,5
" " " "	30 "	65°	14
Frische Leber von Rind	30 "	38°	37,75
" " " "	30 "	55°	9
" " " "	30 "	60°	7,5
Alkoholniederschlag der Leber v. Rind	10 g	38°	43,25
Desgl.	10 "	45°	19
" " "	10 "	50°	7,5
" " "	10 "	55°	4,5
" " "	10 "	60°	2,5
Rote Blutkörperchen von Rind . . .	30 "	38°	32,25
" " " " . . .	30 "	55°	60
" " " " . . .	30 "	60°	75
Alkoholniederschlag der roten Blutkörperchen von Rind	10 "	38°	27
Desgl.	10 "	65°	72,5

Aus den in dieser Tabelle zusammengestellten Versuchen geht deutlich hervor, daß sowohl für das frische Lebergewebe wie für dessen Alkoholniederschlag die Intensität der Reaktion mit zunehmender Temperatur bis 38°—40° steigt. Überschreitet man jedoch 38 bis 40°, so nimmt die Oxydation mit steigender Temperatur ab. Bei einer Temperatur von 60° wird die Kohlensäureentwicklung äußerst schwach. Die unbedeutende Kohlensäuremenge könnte durch das in der Leber enthaltene Blut verursacht sein.

Das Optimum der Temperatur scheint 38° bis 40° zu sein.

Das Blut verhält sich dem Einfluß der Temperatur gegenüber etwas anders. Die Kohlensäureentwicklung ist um so stärker, je höher die Temperatur steigt. Bei einer Temperatur von 60 bis 65° ist die Oxydation der Ameisensäure durch das Blut bedeutend energischer als bei 38—40°.

Dieser Unterschied im Verhalten des Blutes gegenüber der Temperatur gestattet die oxydative Wirkung des Hämoglobins von der der in den Geweben enthaltenen Peroxydase zu unterscheiden.

Wir müssen hier bemerken, daß in unsern Versuchen das ameisensaure Calcium in einer Konzentration von 1 : 100 und bei saurer Reaktion des Mediums (3‰ HCl) angewandt wurde. Unter ähnlichen

Versuchsbedingungen wird die Ameisensäure durch das Wasserstoffsuperoxyd selbst bei einer Temperatur von 60 oder 65° nur in unbedeutender Menge oxydiert. Anders ist es, wenn die Versuchsbedingungen abgeändert werden. In stärkerer Konzentration, etwa 6%, wird die Ameisensäure ziemlich stark bei saurer und sehr schnell bei neutraler Reaktion bei einer Temperatur von 60° oxydiert.

i) Einfluß der bei der Reaktion beteiligten Gewebe- und Wasserstoffsuperoxydmengen.

In den Versuchen, deren Resultate wir bisher mitgeteilt, haben wir stets 30 g Gewebe und 60 ccm einer 1%igen Wasserstoffsuperoxydlösung angewandt. In einer Reihe eigens dazu bestimmter Versuche haben wir den Einfluß verschiedener Mengen sowohl der Gewebe als des dem Reaktionsgemische hinzugefügten Wasserstoffsuperoxyds bestimmen wollen.

In einer Reihe von Versuchen haben wir verschiedene Gewichtsmengen des zu untersuchenden Gewebes bei konstanter Menge des Wasserstoffsuperoxyds genommen. Bei Anwendung verschieden großer Gewebsmengen mußte auch die Konzentration der Salzsäure eine entsprechende Abänderung erfahren. Durch Vorversuche hatten wir bereits bestimmt, daß die optimale Salzsäurekonzentration für verschieden große Gewebemengen verschieden ist. Für in 100 ccm 1%iger Calciumformiatlösung suspendierte verschieden große Gewebemengen ist die optimale Salzsäurekonzentration folgende: Für 15 g Alkoholniederschlag der Leber — 3 bis 4‰, für 30 g frischer Leber oder 10 g des entsprechenden Alkoholniederschlages — 3‰; für 10 g frischer Leber — 2‰, für 30 g anderer Gewebe — 2,5‰ und für 10 g derselben — 1,5‰. Das sind die Säuregrade, die wir in den weiter unten mitzuteilenden Versuchen angewandt haben.

In einer anderen Reihe von Versuchen haben wir bei konstanter Gewichtsmenge des zu untersuchenden Gewebes die Menge des hinzuzufügenden Wasserstoffsuperoxyds variiert. Zu gleicher Zeit haben wir auch den Einfluß verschiedener Konzentrationen des Wasserstoffsuperoxyds auf die Oxydation der Ameisensäure durch die verschiedenen Gewebe geprüft.

In allen Versuchen wurde das Wasserstoffsuperoxyd in Portionen von 2 ccm alle 30 Sekunden in das Reaktionsgemisch gegossen.

In der folgenden Tabelle XI sind einige Versuchstypen wiedergegeben.

Tabelle XI.

Einfluß der Menge des Gewebes und des hinzugefügten Wasserstoffsuperoxyds auf die Oxydation der Ameisensäure.
Versuchsanordnung wie vorher.

Gewebe	Gewicht	Wasserstoff-superoxyd in ccm	Konzentration des Wasserstoff-superoxyds	CO_2 in ccm
Frisches Gewebe:				
Leber von Hammel .	30 g	60	1%	51
„ „ „ . .	10 „	60	1 „	22
„ „ Rind . .	30 „	60	1 „	40
„ „ „ . . .	10 „	60	1 „	16
„ „ Pferd . .	30 „	60	1 „	38
„ „ „ . .	10 „	60	1 „	14
Blut von Hund . . .	30 ccm	60	1 „	20
„ „ „ . . .	10 „	60	1 „	8
„ „ Rind . . .	30 „	60	1 „	19
„ „ „ . . .	10 „	60	1 „	9
Blutkörperchen v. Pferd	30 „	60	1 „	13,5
„ „ „	10 „	60	1 „	7
Lunge von Hammel .	30 g	60	1 „	11
„ „ „ . .	10 „	60	1 „	5
Niere von Pferd . .	30 „	60	1 „	28,8
„ „ „ . . .	10 „	60	1 „	15
Alkoholniederschlag:				
Leber von Rind . . .	21 „	60	1 „	59
„ „ „ . . .	7 „	60	1 „	26,6
„ „ „ . . .	2,3 g	60	1 „	10
„ „ Pferd . .	14 g	60	1 „	41,5
„ „ „ . .	7 „	60	1 „	22,5
„ „ Rind . . .	18 „	60	1 „	67,5
„ „ „ . . .	9 „	60	1 „	37,5
„ „ „ . . .	3 „	60	1 „	21
Blut von Rind . . .	15 „	60	1 „	21,5
„ „ „ . . .	10 „	60	1 „	16
„ „ „ . . .	5 „	60	1 „	7
Frisches Gewebe:				
Leber von Hammel .	30 g	30	1 „	45
„ „ „ . .	30 „	60	1 „	74
„ „ „ . .	30 „	120	1 „	97
Pankreas von Pferd .	30 „	30	1 „	5
„ „ „ . .	30 „	60	1 „	6
„ „ „ . .	30 „	120	1 „	6,8

Gewebe	Gewicht	Wasserstoff-superoxyd in ccm	Konzentration des Wasserstoff-superoxyds	CO_2 in ccm
Muskel von Pferd . .	30 g	30	1 %	5
„ „ „ . .	30 „	60	1 „	5,5
„ „ „ . .	30 „	120	1 „	6
Leber von Hammel .	30 „	120	0,25 %	28
„ „ „ . .	30 „	120	0,5 „	61
„ „ „ . .	30 „	120	1 %	79
„ „ „ . .	30 „	120	2 „	105
„ „ „ . .	30 „	120	3 „	126
Alkohol-niederschlag:				
Leber von Hammel .	15 „	30	1 „	24
„ „ „ . .	15 „	60	1 „	40
„ „ „ . .	15 „	120	1 „	73
„ „ „ . .	10 „	120	0,5 %	67,5
„ „ „ . .	10 „	120	1 %	81
„ „ „ . .	10 „	120	2 „	112
„ „ „ . .	10 „	120	4 „	145
„ „ „ . .	10 „	120	8 „	152

Die Versuche, deren Resultate in vorstehender Tabelle angeführt sind, zeigen erstens, daß mit steigender Menge des benutzten Gewebes die Kohlensäurebildung zunimmt. In manchen Fällen ist die Kohlensäurebildung fast proportional den Gewebemengen. In anderen Fällen jedoch bemerkt man bedeutende Abweichungen. Die Unbeständigkeit der Resultate läßt sich leicht durch die Wirkung der Katalase einerseits und die verschiedene Salzsäurekonzentration andererseits erklären.

Die Menge der bei der Reaktion gebildeten Kohlensäure wächst außerdem mit zunehmender Menge des hinzugefügten Wasserstoffsuperoxyds, wenn es sich um Lebergewebe handelt. Eine Steigerung der Wasserstoffsuperoxydkonzentration hat dieselbe Wirkung. Man beobachtet hier, daß zwischen der Steigerung der Kohlensäurebildung und der Menge oder der Konzentration des Wasserstoffsuperoxyds keine Proportionalität besteht. Die Menge der gebildeten Kohlensäure nimmt langsamer zu als die Menge des Wasserstoffsuperoxyds. Wir ersehen aus den zuletzt hier angeführten Versuchen, daß in den meisten unserer Versuche, die mit Lebergewebe angestellt waren, wir eine größere Kohlensäurebildung hätten erzielen können als die von uns erhaltene. In der Tat haben wir in unseren Versuchen fast immer 60 ccm einer 1%igen Wasserstoffsuperoxydlösung für 30 g Leber angewandt. Wie wir aber soeben gesehen haben, ist die Kohlensäurebildung bedeutend größer, wenn man größere Mengen Wasserstoffsuperoxyds anwendet.

Wenn die Gewebe wenig Peroxydase enthalten, bemerkt man keine Vermehrung der Kohlensäurebildung, wenn man zu 30 g des zu unter-

suchenden Gewebes mehr als 60 ccm einer 1%igen Wasserstoffsuperoxydlösung hinzufügt. Wir müssen daraus schließen, daß in diesem Falle das Wasserstoffsuperoxyd sich eher im Überschusse gegenüber der Peroxydasemenge befindet. Im Gegensatz dazu ist in der Leber die Peroxydase im Überschusse gegenüber dem hinzugefügten Wasserstoffsuperoxyd. Außerdem muß man hier den Umstand in Betracht ziehen, daß ein großer Teil des Wasserstoffsuperoxyds durch die in der Leber in großer Menge enthaltene Katalase zerstört wird und von der Peroxydase nicht ausgenützt werden kann.

Die Resultate der in der Tabelle XI mitgeteilten Versuche sowie die daraus sich ergebenden Schlußfolgerungen weisen darauf hin, daß der Peroxydasereichtum der Leber im Vergleich zu dem der anderen Gewebe bedeutend größer ist, als man es nach den in Tabelle V mitgeteilten Versuchen annehmen konnte.

k) Widerstand der Peroxydase und des Hämoglobins gegen die Einwirkung höherer Temperaturen.

Wir haben die Wirkung mehr oder weniger hoher Temperaturen auf die Peroxydasen der Leber und auf das Hämoglobin bei neutraler, alkalischer und saurer Reaktion des Mediums geprüft. Zu dem Zwecke bringt man 30 g frischer Leber oder 10 g des Alkoholniederschlags oder 30 ccm gewaschener roter Blutkörperchen in 100 ccm Wasser, dem man je nachdem eine bestimmte Menge Alkali (NaOH) oder Säure (HCl) zusetzt. Das Ganze wird in ein Wasserbad von bestimmter konstanter Temperatur gebracht und, nachdem der gewünschte Wärmegrad erreicht, während weiterer 20 Minuten bei dieser Temperatur gelassen. Man läßt abkühlen und fügt die nötige Menge Säure hinzu, um einen Säuregrad von $^{3}/_{1000}$ HCl zu erhalten, und verfährt im übrigen wie in den anderen Versuchen.

Tabelle XII.

Widerstand der Peroxydase oder des Hämoglobins gegen höhere Temperaturen in neutralem, alkalischem oder saurem Medium.

Versuchsanordnung wie früher.

Gewebe	Gewicht	Erreichte Temperatur in Zentigraden	Reaktion des Mediums	CO_2 in ccm
Frische Gewebe:				
Leber von Pferd	30 g	Kontrollversuch		30
" " "	30 "	60°	neutral	31
" " "	30 "	66°	"	6
" " "	30 "	95°	"	2
" " "	30 "	55°	HCl 1‰	31,5
" " "	30 "	55°	HCl 2‰	22,5
" " "	30 "	55°	HCl 3‰	10,5
" " "	30 "	55°	NaOH 4‰	22,5

Gewebe	Gewicht	Erreichte Temperatur in Zentigraden	Reaktion des Mediums	CO_2 in ccm
Leber von Hammel	30 g	Kontrollversuch		78
„ „ „	30 „	60°	neutral	74
„ „ „	30 „	66°	„	6
„ „ „	30 „	95°	„	3
„ „ „	30 „	55°	HCl 2°/oo	52,5
„ „ „	30 „	55°	HCl 3°/oo	22,5
„ „ „	30 „	55°	NaOH 4°/oo	13,5
Rote Blutkörperchen von Rind	30 „	Kontrollversuch		28,5
„ „ „ „	30 „	60°	neutral	30
„ „ „ „	30 „	70°	„	22,5
„ „ „ „	30 „	95°	„	15
„ „ „ „	30 „	55°	HCl 1°/oo	18
„ „ „ „	30 „	55°	HCl 2°/oo	7,5
„ „ „ „	30 „	55°	HCl 3°/oo	7,5
„ „ „ „	30 „	55°	NaOH 2°/oo	28,5
Rote Blutkörperchen von Hund	30 „	Kontrollversuch		22,5
„ „ „ „	30 „	60°	neutral	22,5
„ „ „ „	30 „	70°	„	10,5
„ „ „ „	30 „	95°	„	12
„ „ „ „	30 „	55°	HCl 1°/oo	18
„ „ „ „	30 „	55°	HCl 2°/oo	7,5
„ „ „ „	30 „	55°	NaOH 4°/oo	17
Rote Blutkörperchen von Pferd	30 „	Kontrollversuch		18
„ „ „ „	30 „	60°	neutral	22,5
„ „ „ „	30 „	70°	„	10,5
„ „ „ „	30 „	95°	„	9
„ „ „ „	30 „	55°	HCl 1°/oo	19
„ „ „ „	30 „	55°	HCl 2°/oo	4,5
„ „ „ „	30 „	55°	NaOH 2°/oo	16,5
„ „ „ „	30 „	55°	NaOH 4°/oo	12
Alkoholniederschlag:				
Leber von Pferd	12 g	Kontrollversuch		37,5
„ „ „	12 „	55°	neutral	15
„ „ „	12 „	60°	„	7,5
„ „ „	12 „	66°	„	3
„ „ „	12 „	95°	„	1
„ „ „	15 „	Kontrollversuch		45
„ „ „	15 „	55°	neutral	28,5
„ „ „	15 „	60°	„	6
„ „ „	15 „	95°	„	0,5
„ „ „	15 „	55°	HCl 1°/oo	37,5
„ „ „	15 „	55°	HCl 2°/oo	7,5
„ „ „	15 „	55°	NaOH 4°/oo	15

Aus den in Tabelle XII angeführten Versuchsergebnissen ersieht man, daß die Peroxydase frischer Gewebe bei neutraler Reaktion des Mediums einer Erwärmung auf 60° sehr gut widersteht aber bei 66° fast vollständig zerstört wird. In saurem Medium wird die Peroxydase bei 55° sehr stark angegriffen, und zwar um so stärker, als der Säuregrad höher ist. In alkalischem Medium verhält sich die Peroxydase in ähnlicher Weise. Die nach Fällung mit Alkohol erhaltene Peroxydase scheint im allgemeinen gegen höhere Temperaturen empfindlicher zu sein. Durch Erhitzen auf 55° wird ein Teil des Oxydationsvermögens des Alkoholniederschlages selbst bei neutraler Reaktion des Mediums zerstört. Säure und Alkali begünstigen auch hier die schädliche Wirkung höherer Temperaturen. Das Oxydationsvermögen des Hämoglobins wird durch Erwärmen auf 60° bei neutraler Reaktion des Mediums nicht im geringsten angegriffen. Erhitzen auf 70° schwächt dasselbe bedeutend ab, doch wird selbst bei Siedehitze das Oxydationsvermögen der roten Blutkörperchen in Gegenwart von H_2O_2 nicht ganz vernichtet. Die Empfindlichkeit gegen höhere Temperaturen wird auch durch Hinzufügen von Säure oder Alkali bedeutend gesteigert. Doch wirkt im allgemeinen die Säure schädlicher als das Alkali auf das Oxydationsvermögen des Hämoglobins ein. Auf Grund unserer Versuche können wir die Behauptung aufstellen, daß das Hämoglobin sich ganz wie die Peroxydase gegenüber höheren Temperaturen verhält, mit dem Unterschiede nur, daß sie etwas weniger empfindlich als letztere ist.

Wir sehen außerdem, daß die Wirkung höherer Temperaturen auf die Peroxydase in Bezug auf die Oxydation der Jodwasserstoffsäure sich in derselben Weise kundgibt wie in Bezug auf die Oxydation der Ameisensäure. Wir haben früher beobachtet, daß ein Erwärmen der Gewebeauszüge auf 60° die oxydierende Wirkung derselben auf Jodwasserstoffsäure in Gegenwart von Äthylhydroperoxyd nicht aufhebt, daß aber ein Erwärmen auf 70° dieselbe völlig vernichtet. Ähnliche Resultate können wir in Bezug auf die Oxydation der Ameisensäure verzeichnen.

l) Oxydation von einigen andern der Fettreihe angehörigen Substanzen durch Tiergewebe in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd.

Cervello und Pitini[1]) ist es gelungen, einige Aldehyde, den Propyl-, Valer- und Isobutylaldehyd durch Alkoholniederschläge der Gewebe in Gegenwart von H_2O_2 zu Kohlensäure zu oxydieren.

Wir haben einige Versuche mit Formaldehyd angestellt und gefunden, daß unter sonst gleichen Versuchsbedingungen die Menge der bei Anwendung von Formalin erzeugten Kohlensäure kleiner ist als bei Anwendung von Ameisensäure. Wir haben die Oxydation der andern Aldehyde nicht weiter untersucht, hingegen aber einige organische Säuren sowie Glucose zu oxydieren versucht.

In der Tabelle XIII bringen wir einige Versuchsergebnisse.

[1]) loc. cit.

Tabelle XIII.

Oxydation von einigen Fettsäuren und von Glucose durch Tiergewebe in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd.

Versuchsanordnung wie gewöhnlich.

Gewebe	Gewicht	Die zu oxydierende Substanz	Gewicht	CO_2 in ccm
Alkoholniederschlag				
Leber von Rind	15 g	essigsaures Ca	2 g	Spuren
„ „ „	15 „	milchsaures Ca	2 „	„
„ „ „	15 „	propionsaures Na	2 „	„
„ „ „	15 „	buttersaures Na	2 „	„
„ „ „	15 „	valeriansaures K	2 „	„
Leber von Pferd	10 „	Glucose	1 „	„
„ „ „	10 „	oleinsaures Na	1 „	„
„ „ „	10 „	palmitinsaures Na	1 „	„
„ „ „	10 „	stearinsaures Na	1 „	„

Aus den in dieser Tabelle mitgeteilten Versuchsergebnissen ersieht man, daß die Menge der bei Anwendung von Glucose oder von verschiedenen Fettsäuren an Stelle der Ameisensäure gebildeten Kohlensäure nur unscheinbar ist. Battelli hatte bereits in seinen früheren Versuchen ein negatives Resultat erhalten. Doch wollen wir nicht behaupten, daß die hier untersuchten Substanzen durch die Peroxydase der Leber in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd überhaupt nicht oxydiert werden. Wir haben diese Frage noch nicht näher geprüft. Wir können nur sagen, daß die Oxydation, falls sie stattfindet, keine tiefgehende ist und nicht bis zur Bildung von Kohlensäure geht.

m) Oxydation der Ameisensäure durch Peroxydase in Gegenwart von Äthylhydroperoxyd.

Unsere Versuche betreffend die Oxydation der Ameisensäure sind in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd ausgeführt worden. Das Äthylhydroperoxyd haben wir nicht anwenden können, da es sehr schwer ist, größere Quantitäten derselben zur Verfügung zu haben. Wir haben bloß einige Versuche gemacht, um zu prüfen, ob bei der Oxydation der Ameisensäure durch Peroxydase dieses Peroxyd an Stelle des H_2O_2 angewandt werden kann. Durch Vorversuche hatten wir festgestellt, daß in den von uns angewandten Versuchsbedingungen (Temperatur und Konzentration der Ameisensäure und des Peroxyds) die Kohlensäureentwicklung bei Einwirkung des Äthylhydroperoxyds auf Ameisensäure unter Ausschluß der Peroxydase eine kaum nennenswerte ist.

Da das Äthylhydroperoxyd durch die in den Geweben enthaltene Katalase keineswegs zerstört wird, konnten wir die Reaktion in neutralem Medium ausführen und uns auf diese Weise überzeugen, daß die Reaktion in neutralem Medium energischer als in saurem Medium vor sich geht.

In diesen Versuchen haben wir den Alkoholniederschlag der Leber benutzt. Das frische Gewebe hat den Nachteil, das Resultat durch die bei der Gewebeatmung entstehende Kohlensäure zu trüben.

Die Äthylhydroperoxydlösung wird in einem Male dem Reaktionsgemische beigefügt, und nach 30 Minuten wird das Ganze stark angesäuert und die entwickelte Kohlensäure nach dem früher beschriebenen Verfahren bestimmt.

In Tabelle XIV teilen wir die Resultate einiger Versuchstypen mit. Zu je 1 g des benutzten Gewebes fügt man 10 ccm Wasser und die in der Tabelle angegebene Menge Äthylhydroperoxyd hinzu. In einigen Kontrollversuchen haben wir das Äthylhydroperoxyd auf den Alkoholniederschlag der Leber ohne Zusatz von Ameisensäure einwirken lassen

In einigen Versuchen haben wir den mit Wasser vermischten Alkoholniederschlag der Leber 15 Minuten lang einer Temperatur von 66° ausgesetzt und darauf ihre Wirkung auf Ameisensäure in Gegenwart von Äthylhydroperoxyd untersucht.

Tabelle XIV.

Oxydation der Ameisensäure durch die Peroxydase der Leber in Gegenwart von Äthylhydroperoxyd.

In allen Versuchen ist der Alkoholniederschlag der Leber benutzt worden.

Alkoholniederschlag der Leber	Ameisensaures Ca	Äthylhydroperoxyd 1%	Reaktion des Mediums	CO_2 in ccm
10 g	1 g	10 ccm	neutral	36
10 „	1 „	10 „	HCl 3‰	25
5 „	0,50 g	5 „	neutral	16
5 „	0,50 „	5 „	HCl 3‰	9
5 „	—	5 „	neutral	Spuren
2 „	0,20 „	5 „	neutral	9
2 „	0,20 „	5 „	HCl 3‰	7,5
1 „	0,20 „	5 „	neutral	12
1 „	0,20 „	5 „	HCl 3‰	9
1 „	—	5 „	neutral	Spuren
5 g auf 70° erhitzt	0,50 „	5 „	neutral	Spuren
2 g auf 70° erhitzt	—	7,5 „	neutral	Spuren

Aus den in Tabelle XIV mitgeteilten Versuchen ergibt sich, daß die Peroxydase der Leber in Gegenwart von Äthylhydroperoxyd sehr energisch Ameisensäure oxydiert und daß diese Oxydation in neutralem Medium stärker als in saurem Medium ist. Bei Anwendung von Wasserstoffsuperoxyd haben wir im Gegenteil beobachtet, daß die Oxydation nur in saurem Medium energisch war, während die Reaktion in neutralem oder alkalischem Medium nur unbedeutend war. Wie wir bereits früher betont haben, ist der die Reaktion begünstigende Einfluß des sauren Mediums hauptsächlich dem Umstande zuzuschreiben, daß durch Zusatz

von Säure die Zersetzung des Wasserstoffsuperoxyds durch die in den Geweben enthaltene Katalase verlangsamt wird.

Im Laufe unserer Versuche haben wir die Beobachtung machen können, daß bei genügender Peroxydasemenge aller aktiver Sauerstoff des hinzugefügten Äthylhydroperoxyds zur Oxydation der Ameisensäure benutzt wurde. In der Tat war in einem unserer Versuche (Nr. 1 der Tabelle) in neutralem Medium die Menge der Äthylhydroperoxyds 0,10 g, was einer Menge von 0,026 gr aktiven Sauerstoffs oder 18 ccm O_2 entspricht. Wenn nun die entsprechende Menge des in der Ameisensäure enthaltenen Wasserstoffs zu Wasser oxydiert würde, müßte die Menge der zugleich dabei entwickelten Kohlensäure 36 ccm betragen. In unserem Versuche haben wir genau diese Menge Kohlensäure erhalten.

Ein Erwärmen der Peroxydase auf 66° vernichtet die Oxydationswirkung derselben auf Ameisensäure in Gegenwart von Äthylhydroperoxyd ebensogut wie in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd.

Im Laufe dieser Versuche haben wir auch beobachtet, daß die Peroxydase der Leber in Gegenwart von Äthylhydroperoxyd ebensowenig wie in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd Milchsäure zu Kohlensäure oxydiert.

III. Allgemeine Betrachtungen.

Im Laufe dieser unserer Untersuchungen haben wir die Beobachtung machen können, daß die Bläuung der Jodstärke in Gegenwart von Äthylhydroperoxyd keine sichere Reaktion für die Peroxydase tierischer Gewebe darstellt. Die Anwendung von Wasserstoffsuperoxyd an Stelle des Äthylhydroperoxyds, wie es v. Czyhlarz und v. Fürth bei ihren Untersuchungen über tierische Peroxydasen getan, gibt noch weniger sichere Resultate. Es scheint uns selbstverständlich, daß diese Reaktion zu quantitativen Zwecken nicht benutzt werden kann.

Die andere von uns angewandte Methode, die in der Oxydation von Ameisensäure besteht, ist in dieser Beziehung zuverlässiger und gestattet, bis zu einer gewissen Grenze, sichere Resultate bei der quantitativen Bestimmung des Peroxydasegehaltes der verschiedenen Gewebe zu erhalten. Die Betrachtungen, die wir über die Peroxydase der Tiergewebe im allgemeinen anstellen wollen, stützen sich also hauptsächlich auf die Resultate, die wir bei der Oxydation der Ameisensäure durch die Tiergewebe in Gegenwart eines Peroxyds erhalten haben.

Die verschiedenen Tiergewebe, namentlich die Leber; das Blut und die Niere oxydieren die Ameisensäure in Gegenwart

von Wasserstoffsuperoxyd unter Entwicklung von Kohlensäure. Andrerseits unterscheidet sich die Oxydationswirkung des Blutes von der der übrigen Gewebe durch den Umstand, daß die Reaktion in Gegenwart von Blut in saurem Medium um so energischer verläuft, je höher die Temperatur ist. Bei einer Temperatur von 60° in saurem Medium (HCl 3 $^0/_{00}$) oxydiert das Blut in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd Ameisensäure sehr energisch, während unter denselben Bedingungen die anderen Gewebe völlig wirkungslos sind.

Wir müssen folglich zwei Arten von Substanzen unterscheiden, welche Ameisensäure in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd oxydieren. Die eine dieser Substanzen findet sich im Blute vor und ist wahrscheinlich mit dem Blutfarbstoffe, dem Hämoglobin oder einer seiner Komponenten identisch. Wir könnten sie nach dem Beispiel von v. Czyhlarz und v. Fürth, Buckmaster als Pseudoperoxydase bezeichnen. Die andere Substanz, die in den verschiedenen Geweben enthalten ist, besitzt mehrere Eigenschaften, die sie als Peroxydase charakterisieren. Sie wirkt nur in Gegenwart eines Peroxyds (Wasserstoffsuperoxyd oder Äthylhydroperoxyd). wird durch Alkohol gefällt und durch Erhitzen zerstört. Anderseits besitzen wir aber nicht genügend Beweise, um die enzymatische Natur dieser Substanz definitiv bejahen zu können.

Mit Hilfe der Pflanzenperoxydasen ist es bisher nur gelungen, in Gegenwart von Peroxyden den Wasserstoff der Hydroxyle, der Phenole, der aromatischen Amine sowie der Jodwasserstoffsäure zu oxydieren. Die Oxydation der Ameisensäure durch die tierische Peroxydase in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd oder Äthylhydroperoxyd, die wir in den bisher mitgeteilten Versuchen studiert haben, scheint zur selben Kategorie zu gehören. In der Tat handelt es sich bei der Oxydation der Ameisensäure wahrscheinlich um eine Oxydation des Wasserstoffatoms derselben. Es genügt den Wasserstoff des einfachen Ameisensäuremoleküls zu oxydieren, um sofort eine Kohlensäureentwicklung hervorzurufen.

Die Pflanzenperoxydasen bringen anderseits eine völlige Oxydation komplexer Moleküle unter Bildung von Endprodukten (Kohlensäure, Wasser usw.) nicht zustande. Die tierische Peroxydase verhält sich in dieser Beziehung ebenso. Die ver-

schiedenen der Fettreihe angehörigen organischen Säuren sowie die Glucose bilden unter dem Einflusse der tierischen Peroxydase + Peroxyd keine Kohlensäure. Wenn wir auch nicht behaupten wollen, daß überhaupt keine Oxydation stattgefunden — wir haben die Frage nicht eingehender untersucht —, so müssen wir immerhin annehmen, daß die Oxydation, wenn eine solche stattgehabt, keine tiefgehendere war und nur zur Bildung von Zwischenprodukten geführt hat.

Eine Frage, die sich aufwirft, ist die, ob die in den Geweben enthaltene, die Ameisensäure oxydierende Peroxydase mit der die Jodwasserstoffsäure oxydierenden Peroxydase identisch sei. Eine genaue quantitative Untersuchung könnte Aufschluß darüber geben, aber eine solche ist aus den früher hier angeführten Gründen nicht durchführbar. Wir können also nicht entscheiden, ob wir in den beiden Reaktionen es mit einer oder mit zwei gänzlich verschiedenen Peroxydasen zu tun haben. Das Verhalten gegen die Temperatureinwirkung scheint jedoch eher dafür zu sprechen, daß wir es mit ein und derselben Substanz zu tun haben. In der Tat vernichtet ein Erwärmen der Gewebe auf 66° sowohl die Oxydationswirkung auf Ameisensäure als auf Jodwasserstoffsäure.

Wenn wir den Peroxydasegehalt der verschiedenen Organe genauer betrachten, sehen wir, daß im allgemeinen diejenigen Gewebe, die den größten Peroxydasegehalt besitzen, zugleich auch die größten Mengen Katalase enthalten. So sind zum Beispiel die Leber und die Niere, die den größten Reichtum an Katalase besitzen, zugleich diejenigen Organe, deren Peroxydasegehalt sehr stark ist. Man muß hier jedoch bemerken, daß dieser Parallelismus keine absolute Gültigkeit hat. Wenn wir die Leber des Kaninchens mit der Leber des Rindes oder des Hammels in Bezug auf ihren Peroxydasegehalt und ihren Katalasereichtum miteinander vergleichen, finden wir, daß, während die Kaninchenleber 20 mal weniger Katalase enthält als die Leber des Rindes oder des Hammels (Battelli und Stern[1]), ihr Gehalt an Peroxydase sich nicht viel von dem Peroxydasegehalt der Leber dieser eben genannten Tiere unterscheidet. Wir weisen jetzt nur auf den Parallelismus zwischen Peroxydase-

---

[1]) loc. cit.

und Katalasegehalt der verschiedenen Tiergewebe hin, ohne weitere Schlüsse daraus ziehen zu wollen.

Wir hatten in früheren Arbeiten gezeigt,[1]) daß in den Tiergeweben und hauptsächlich in den Muskeln sich eine in Wasser lösliche Substanz vorfindet, die die Gewebeatmung aktiviert, und die selbst bei der Gewebeatmung unumgänglich ist. Es lag also nahe, die Frage zu stellen, ob diese die Gewebeatmung aktivierende Substanz mit der von uns untersuchten Peroxydase nicht identisch sei. Wir können diese Frage in negativem Sinne beantworten. Unter den verschiedenen Gründen genügt es, folgenden Grund anzuführen: Die Muskeln, die das an Peroxydase ärmste Gewebe darstellen, sind anderseits sehr reich an aktivierender Substanz.

Was nun die Rolle der Peroxydase im lebenden Organismus betrifft, ist vor allen Dingen zu entscheiden, ob dieselbe dazu beitragen kann, die in den höheren Tierorganismen in geringer Menge sich vorfindende oder dem Organismus zugeführte Ameisensäure zu oxydieren. Die Antwort ist nicht leicht. Wir wissen einerseits, daß die dem Organismus zugeführte Ameisensäure nur langsam oxydiert wird. Ein großer Teil derselben erscheint im Harn, wo man einige Stunden nach der Injektion Ameisensäure noch konstatieren kann (Bonanni[2]), Fleig[3]) usw.). Anderseits werden die höheren organischen Säuren im Tierorganismus schnell verbrannt, und zwar um so leichter, je größer das Molekül ist. Wie wir aber im Laufe unserer Versuche gesehen haben, oxydiert die Tierperoxydase in vitro mit Leichtigkeit die Ameisensäure, ohne die anderen gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren anzugreifen. Anderseits wird die Ameisensäure, die in vitro durch die Peroxydase schnell zersetzt wird, im lebenden Tierorganismus nur langsam verbrannt. Es ist also nach dem soeben Gesagten schwer zu

---

[1]) F. Battelli und Mlle. L. Stern: Recherches sur l'activation de la respiration tissulaire par les extraits musculaires. Journ. de Physiol. et de Pathol. générale **1907**, 737.

[2]) Bonanni, Sul comportamente del formiato e dell'acetato di calcio nell'organismo. Archivio di farmacologia sperimentale **6**, 419, 1907.

[3]) Fleig, L'élimination urinaire des formiates. Arch. internat. de pharmacodyn. et thérap. 18, 89, 1908.

entscheiden, ob im lebenden Tierorganismus die von uns studierte Peroxydase dazu beitragen kann, die Ameisensäure zu oxydieren, wie sie es in vitro in Gegenwart eines Peroxyds zustande bringt. Es ist augenscheinlich, daß die Hauptrolle der Peroxydase nicht in der Oxydation der Ameisensäure besteht. Doch dürfen wir nicht außer acht lassen, daß nach Fleig[1]) die Oxydation der Ameisensäure in vivo hauptsächlich in der Leber stattfindet, was mit unseren Versuchsergebnissen im Einklange steht.

Wir enthalten uns absichtlich jeder Hypothese über die möglichen Funktionen der Peroxydase im lebenden Tierorganismus. Die bisher bekannten Tatsachen sind nicht zahlreich genug, um sie zur Grundlage einer Theorie der Oxydationsvorgänge machen zu können. Wir ziehen es also vor, durch Aufstellung neuer Hypothesen dieses ohnehin stark verwickelte Problem nicht noch mehr zu verwirren.

Experimentelle Ergebnisse.

1. Alle Gewebe höherer Tiere können die Bläuung des Jodstärkekleisters in Gegenwart von Äthylhydroperoxyd beschleunigen. In Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd ist die Reaktion in den meisten Fällen dank der in den Geweben enthaltenen Katalase negativ. Die Katalase zersetzt sehr energisch das Wasserstoffsuperoxyd und verhindert auf diese Weise seine Wirkung.

2. In Gegenwart von Äthylhydroperoxyd sind die Resultate für ein und dasselbe Gewebe verschiedener Individuen derselben Tiergattung nicht beständig. Die individuellen Verschiedenheiten sind sehr groß. Während ein bestimmtes Gewebe des einen Individuums eine sehr energische Oxydationswirkung gegenüber Jodwasserstoffsäure entwickelt, kann dasselbe der gleichen Tiergattung aber einem andern Individuum entstammende Gewebe völlig inaktiv sein oder sogar eine verzögernde Wirkung ausüben.

Die Bläuung der Jodstärke ist eine unsichere qualitative Reaktion und kann keineswegs zu quantitativen Bestimmungen des Peroxydasegehaltes der verschiedenen Tiergewebe benutzt werden.

---

[1]) loc. cit.

3. Das Hämoglobin beschleunigt energisch die Oxydation des Jodwasserstoffs in Gegenwart von Äthylhydroperoxyd.

4. Durch Erwärmen auf 70° verlieren die Gewebeauszüge die Fähigkeit, die Bläuung der Jodstärke in Gegenwart von Äthylhydroperoxyd zu beschleunigen. — Verdünnte Säuren wirken in derselben Weise auf die Gewebeauszüge ein. — Unter denselben Bedingungen wird das Oxydationsvermögen des Hämoglobins stark herabgesetzt, aber nicht ganz vernichtet.

5. Die verschiedenen Gewebe höherer Tiere besitzen die Fähigkeit, in vitro in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd die Ameisensäure unter Entwicklung von Kohlensäure zu oxydieren.

Diese Eigenschaft kann ebenfalls einer in den Geweben enthaltenen Peroxydase zugeschrieben werden. Die Oxydation findet bei Abwesenheit von H_2O_2 nicht statt.

6. Bas Blut besitzt ebenfalls die Fähigkeit, Ameisensäure in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd zu oxydieren. — Dieses Oxydationsvermögen des Blutes ist wenigstens zum größten Teil dem Blaufarbstoff — dem Hämoglobin zuzuschreiben.

7. Die Peroxydase sowie das Hämoglobin verlieren nicht ihr Oxydationsvermögen gegenüber Ameisensäure nach Fällung mit Alkohol.

8. Die Oxydation der Ameisensäure durch die verschiedenen Tiergewebe sowie durch das Blut in Gegenwart von H_2O_2 ist in saurem Medium bedeutend energischer als in neutralem oder alkalisch reagierendem Medium. — Der begünstigende Einfluß der sauren Reaktion ist namentlich dem Umstande zu verdanken, daß in saurem Medium die Zersetzung des Wasserstoffsuperoxyds durch die in den Geweben enthaltene Katalase verzögert wird. — In alkalisch oder neutral reagierendem Medium wird hingegen das Wasserstoffsuperoxyd unmittelbar durch die Katalase zersetzt, namentlich wenn es sich um Gewebe handelt, die reich an diesem Ferment sind (Leber, Niere usw.).

9. In bezug auf ihren Gehalt an Peroxydase können im allgemeinen die verschiedenen, von uns untersuchten Tiergewebe in folgender absteigender Reihenfolge geordnet werden: Leber, Niere, Milz, Lunge, Pankreas, Lymphdrüse, Rindmuskel, Gehirn, Hoden, Hundemuskel, Thymus, Nebenniere, Schilddrüse, Kaninchenmuskel.

Die Leber besitzt ein bedeutend stärkeres Oxydationsvermögen gegenüber Ameisensäure als die anderen Gewebe.

10. Die Oxydationswirkung des Blutes (Pseudoperoxydase) ist nächst der der Leber die kräftigste.

11. Die Menge der entwickelten Kohlensäure, d. h. die Intensität der Oxydation der Ameisensäure nimmt mit steigender Menge des hinzugefügten Wasserstoffsuperoxyds zu. Bei konstanter Wasserstoffsuperoxydmenge nimmt die Kohlensäureentwicklung mit steigender Menge des hinzugefügten Gewebes zu.

12. Die Oxydationswirkung der Peroxydase in saurem Medium nimmt mit steigender Temperatur bis 38°—40° zu. Von da ab bewirkt eine weitere Steigerung der Temperatur vielmehr eine Verminderung der Oxydation, die bei 65° fast vollständig aufhört. Das Optimum der Temperatur scheint somit bei 38 bis 40° C zu sein. Das Hämoglobin verhält sich etwas anders. In sauer reagierendem Medium ist die Oxydation der Ameisensäure durch Hämoglobin in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd bei einer Temperatur von 55 bis 60° C bedeutend energischer als bei 38° C.

13. Die Peroxydase der frischen Gewebe wird durch Erhitzen auf 66° in neutralem Medium vernichtet. In saurem oder alkalischem Medium wird dieselbe bereits bei 55° C zum größten Teil zerstört. Unter denselben Bedingungen wird das Oxydationsvermögen des Hämoglobins etwas weniger angegriffen.

14. Der Formaldehyd wird ebenfalls durch die Peroxydase der Tiergewebe in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd oxydiert, aber die dabei entwickelte Kohlensäuremenge ist geringer als bei der Oxydation von Ameisensäure.

15. Die übrigen der Fettreihe angehörigen organischen Säuren (Essig-, Butter-, Valerian-, Milch-, Olein-, Palmitin- und Stearinsäure sowie der Traubenzucker entwickeln keine Kohlensäure, wenn Tiergewebe in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd auf sie einwirken.

16. Die Peroxydase der Leber oxydiert die Ameisensäure in Gegenwart von Äthylhydroperoxyd ebenso energisch wie in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd. Die Oxydation ist im neutralen Medium energischer als im sauer reagierenden Medium.

Vergleichende Untersuchungen über das Verhalten der Frauenmilch zu Säure und Lab.

Von

Dr. Engel.

(Aus der akademischen Klinik für Kinderheilkunde in Düsseldorf.)

(Eingegangen am 16. Juli 1908.)

Mit 1 Figur im Text und 1 Tafel.

Von den vielen Unterschieden zwischen der Kuh- und Frauenmilch ist mit am längsten bekannt, daß die letztere sich nicht ohne weiteres durch Lab oder Säure zur Gerinnung bringen läßt. Für die Kinderheilkunde ist diese Frage von einschneidender Wichtigkeit, weil die schwierige Abtrennung des Caseins sicherlich bisher einer gründlichen Erforschung dieses Körpers im Wege gestanden hat, und weil wir uns ohne ein rechtes Bild von den Gerinnungsvorgängen im Magen auch über ihre Bedeutung für die Verdauung nicht klar werden können. Wir wissen allerdings aus den Befunden, welche man mit Hilfe des Magenschlauches erheben kann, daß die Frauenmilch im Magen schnell ausflockt, zwar nicht in einen zusammenhängenden Klumpen oder wenigstens zu groben Gerinnseln wie die Kuhmilch, aber doch immerhin in deutlich sichtbaren Flocken. Dieser Unterschied kann ganz ohne Bedeutung nicht sein, wenn man bedenkt, wie die Milchverdauung im Magen abläuft. Tobler, welcher mit der Grütznerschen Versuchsanordnung arbeitete, fand nämlich, daß die Verarbeitung der Kuhmilch im Magen folgendermaßen vor sich geht: Zunächst gerinnt die Milch, die Molke wird abgepreßt und schnell durch den Pylorus entfernt. Alsdann greift das Magensekret konzentrisch an dem zurückbleibenden Käseklumpen an und daut

ihn allmählich von der Peripherie ab. Tobler selbst stellt sich vor, daß auch der Abbau der Frauenmilch sich ganz ähnlich vollzieht; wir werden jedoch am Schluß sehen, daß gerade die Sonderheiten der Labwirkung auf die Frauenmilch den Rückschluß gestatten, daß die Verhältnisse nicht absolut analog sind.

Ich ging bei meinen Untersuchungen von dem Bestreben aus, Aufschlüsse über die normale Magenverdauung des Säuglings zu erhalten, und glaubte gerade im Hinblick auf die Versuche Toblers mich zunächst mit den Gerinnungsvorgängen befassen zu müssen. Dieses ganze Thema war bis vor kurzem fast gänzlich unbearbeitet. Von älteren Autoren (Biedert, Pfeiffer) war im wesentlichen nur die schwere Gerinnbarkeit der Muttermilch durch Säure konstatiert worden, nicht aber unter welchen Bedingungen man doch eine Ausscheidung des Caseins erzielen kann. Pfeiffer allerdings hatte bereits auf einen der wichtigsten Umstände aufmerksam gemacht, nämlich, daß man den Zusatz von Säure tropfenweise genau dosieren müßte, wenn man einen Erfolg erzielen wollte.

Nachdem nun in der jüngeren Zeit Ludwig Meyer einmal kurz erwähnt hatte, daß ihm durch eine geeignete Behandlung der Frauenmilch mit Säure, Lab und Kälte eine gute Scheidung in Casein und Molke gelungen sei, haben wir weitere methodische Fortschritte in der neuesten Zeit durch die interessanten Untersuchungen von Fuld und Wohlgemut und von B. Bienenfeld gemacht. Den erstgenannten Autoren verdanken wir die Feststellung, daß Milch, welche weder mit Lab allein noch auch mit Lab und Säure ausfalle, sehr gut gerinnbar werde, wenn man sie der Kälte aussetzt, am besten wenn man sie dreimal 24 Stunden gefroren halte (Frigo). Derartige Milch, die ich übrigens der Kürze wegen einfach „Eismilch“ nennen will, soll nach Angabe der Autoren auf Zusatz geringer Säuremengen (1 Tropfen $5^0/_0$ige Essigsäure) leicht und schnell ausflocken. Prompte Wirkung erhielten sie auch durch kombinierte Einwirkung von $^n/_{10}$-Salzsäure und Lab und durch Chlorcalcium und Lab, im letzteren Falle jedoch etwas schwächer. Sie erklären sich die Einwirkung der Kälte, indem sie annehmen, die Frauenmilch befinde sich im allgemeinen in einem zur Säure- bzw. Labfällung ungeeigneten Zustande, der durch

das Gefrieren in dem Sinne beeinflußt wird, daß im kolloidalen Zustande des Caseins eine Veränderung im Sinne einer Kornvergrößerung eintrete. Der zwingende Beweis hierfür steht noch aus. Der Fortschritt, welchen wir B. Bienenfeld verdanken, beruht darin, daß sie wiederum auf den Befund Pfeiffers hingewiesen hat, die Säure müßte bei Fällung der Frauenmilch sehr genau dosiert werden. Sie fand, daß die Milch, besonders wenn man sie verdünnt, bei einer gewissen optimalen Ansäuerung ausflocke, und zwar (sie benutzte Milchsäure) bei einer Acidität von 2,2 bis 2,4 $^{n}/_{10}$-Milchsäure auf 10 ccm Milch. Bienenfeld machte Versuche mit Säure allein und auch in Verbindung mit Lab und fand, daß sie, wenn sie den Stickstoffgehalt des Filtrates in beiden Fällen untersuchte, annähernd gleiche Prozentzahlen des Gesamtstickstoffs erhielt Hieraus folgerte sie, daß der Zusatz von Lab im ganzen bedeutungslos sei, daß es sich auch bei gemeinsamer Säure- und Labwirkung im Prinzip nur um eine Säurefällung handle. Andernfalls hätte man nämlich, da in der Kuhmilch bei der Labung eine Albumose abgespalten werde, gemäß einem Analogieschluß auch in der Frauenmilchmolke nach der Labung einen höheren prozentualen Stickstoffgehalt finden müssen, wie nach der Säuerung allein. Der Endschluß der Bienenfeldschen Arbeit geht demgemäß dahin, daß die Frauenmilch im Grunde genommen immer nur durch Säure in Casein- Fett und Molke zerlegt werde; ein Endschluß, der sich übrigens nicht ganz leicht aus dem Aufsatz ableiten läßt, weil dauernd Labung und Gerinnung synonym gebraucht werden.

Die für die Physiologie der Milchverdauung nicht unerhebliche Folgerung Bienenfelds ist schon von Fuld und Wohlgemut bekämpft worden, welche mit Recht die für die Frauenmilch gar nicht sichergestellte Albumosenabspaltung mit der konsekutiven Verschiebung der N-Verteilung als ein allzu unsicheres Kriterium der Fällungsvorgänge betrachten. Ebenso mit Recht weisen sie aber gleich darauf hin, daß die eigenen Versuche Bienenfelds zum Teil für eine Labwirkung sprechen, da in einigen Fällen die Ausflockung der angesäuerten Milch erst nach Labzusatz eintrat. Außerdem führen sie für die Möglichkeit einer Labung der Frauenmilch die Tatsache ins Feld, daß es ihnen selbst gelang, in

Eismilch eine Gerinnung ausschließlich durch Zusatz von Lab und Chlorcalcium zu erzeugen. Auf die Kritik all dieser Tatsachen gehe ich erst im 2. Teil dieses Artikels ein (s. S. 103). Auf Grund der vorliegenden Erfahrung spitzt sich die Fragenstellung hinsichtlich der Gerinnbarkeit der Muttermilch auf folgende Punkte zu:

1. Tritt in genuiner Milch Ausflockung durch die Wirkung von Säure oder Lab ein und eventuell unter welchen quantitativen Bedingungen?

2. Besteht ein Unterschied zwischen der Reaktion, welche durch Säure allein und derjenigen, welche durch kombinierte Wirkung von Säure und Lab erzielt wird?

3. Läßt sich tatsächlich die Gerinnbarkeit der genuinen Frauenmilch durch irgendwelche Mittel erhöhen und wie verhält es sich insbesondere mit der Kältewirkung?

Ich will zunächst hier nur auf die ersten beiden Punkte eingehen, weil ja sie vor allem dem Kliniker wichtig für die Fragen der Verdauungsphysiologie sind, und weil wir wissen, daß im Magen des Säuglings Säure und Lab sicherlich zusammen vorkommen. Erst kürzlich konnte ich an reinem, reflektorisch sezerniertem Magensaft zeigen, daß beide sogar reichlich produziert werden. (S. Literaturverzeichn. Nr. 3.)

In der ersten Frage herrscht hinsichtlich des Lab Einstimmigkeit. Das Ferment allein hat gar keine Wirkung; bezüglich der Säuerung ist das Wesentliche im Prinzip schon von Pfeiffer erledigt und von Bienenfeld neu bestätigt und näher präzisiert worden. Es läßt sich in der Tat in genuiner Frauenmilch eine Ausfällung durch Säure allein erzielen, wenn man nur ein geeignetes Maß hiervon nimmt. Diese so früh bekannte Tatsache ist später mehr oder minder auch bei denen unbeachtet geblieben, welche sich bemühten, reines Casein zum Zwecke der Analyse zu gewinnen, und ich glaube, daß sie diesem Versäumnis in erster Linie ihre entmutigenden Mißerfolge zu verdanken haben. Es ist daher unleugbar ein großes Verdienst von Bienenfeld, auf das Säureoptimum der Frauenmilchfällung wieder hingewiesen zu haben.

Freilich genügt es nicht, wenn man eine optimale Fällung erzielen will, nur das Bestmaß an Säure zu finden, sondern man muß auch noch eine Anzahl anderer auf die Fällung ein-

wirkender Faktoren berücksichtigen, welche von solchem Einfluß sein können, daß bei ihrer Vernachlässigung scheinbar eine wesentliche Gerinnung nicht eintritt, auf welche Acidität auch immer man die Milch bringen mag. Auf all dies will ich jedoch heute nicht eingehen und sie gewissermassen als bekannt voraussetzen, indem ich mir vorbehalte, in einem späteren Artikel näher darauf zurückzukommen. Die Fällbarkeit der genuinen Frauenmilch ist, um es kurz zu sagen, außer von dem Maße der zugesetzten Säure abhängig von

1. dem Grade der Verdünnung,
2. dem Fettgehalt,
3. bei der Labfällung von der Anwesenheit ausreichender Kalkmengen.

Zu 1 will ich noch folgendes bemerken: Es ist ja allgemein üblich, Milch, die Kuhmilch vor der Säureausfällung des Caseins zu verdünnen. Auch bei der Frauenmilch ist es sehr vorteilhaft, von diesem Hilfsmittel Gebrauch zu machen, und zwar empfiehlt sich, wie es auch Bienenfeld angibt, eine 4 bis 5fache Verdünnung.

Bezüglich des Fettgehaltes, d. h. seines Einflusses auf die Ausflockung der Frauenmilch, ist bisher gar nichts bekannt gewesen. Man kann sich jedoch leicht davon überzeugen, daß mit dem Fettgehalt auch die Leichtigkeit und Vollständigkeit der Caseinabtrennung, ceteris paribus natürlich, sich ändert. Wirklich gut entfettete Frauenmilch ist außerordentlich schwer im Sinne der Caseinabscheidung zu beeinflussen. Auch in der Nichtachtung dieser Tatsache liegt ein Teil der Mißerfolge begründet, den frühere Autoren fast immer hatten bei dem Bemühen, Casein rein darzustellen. Sie gingen nämlich meist, um das lästige Entfetten des Filterrückstandes zu vermeiden, von Magermilch aus und stießen demgemäß auf noch mehr Schwierigkeiten bei der Fällung, wie sie ohnehin schon in der Natur der Frauenmilch begründet liegen.

Auf die Bedeutung des Kalkes komme ich im letzten Teile dieser Abhandlung zu sprechen.

Methodik.

Die Methodik meiner Untersuchung mußte, da absolute Werte nach der Natur der Sache nur schwer zu erreichen sind,

dahin zielen, Vergleichswerte zu finden. Zu diesem Behufe habe ich mich mit großem Nutzen einer Reihenanordnung bedient, wie sie ähnlich besonders bei serologischen Arbeiten üblich ist und wie sie auch gerade für Versuche mit Labferment schon öfter verwendet worden ist (s. Taf. 1). Ich bin im allgemeinen so vorgegangen, daß ich eine Reihe von Reagensgläsern mit der gleichen Menge Milch beschickte, die entsprechenden Reagenzien zusetzte und dann alle Röhrchen auf das gleiche Volumen auffüllte. Ich möchte gleich bemerken, daß ich der Sparsamkeit halber, von wenigen Versuchen abgesehen, ausschließlich mit 1 ccm Milch mich begnügt habe und das Gesamtvolumen immer auf 5 ccm gebracht habe. Ich habe an dieser Anordnung ganz starr festgehalten, um wenigstens einen gewissen Vergleich der Versuche untereinander zu ermöglichen. Mangelhaft mußte er immer bleiben, weil, wie sich gleich zeigen wird, die Beurteilung des Erfolges sich zahlenmäßig nicht recht fassen läßt. Die ganze Anordnung eines derartigen Versuches, z. B. mit abgestuften Säuremengen in einer Reihe nebeneinander anstatt in einzelnen Versuchen hintereinander, hat trotzdem so große Vorzüge, daß es kaum notwendig ist, ausdrücklich darauf hinzuweisen. Man kann mit einem Blick alles übersehen, die Stärke der Reaktion in den dicht nebeneinanderstehenden Röhrchen vergleichsweise abschätzen und so die Grenzen und den Höhepunkt der Wirkung leicht bestimmen (s. Taf. 1). Einen Nachteil mußte ich allerdings bei meinem Vorgehen in den Kauf nehmen. Da ich mich sehr großer Reagensglasgestelle bediente (für 24 Eprouvetten), so mußte ich davon Abstand nehmen, sie in ein Wasserbad zu bringen, sondern ich mußte sie zum Zwecke der Erwärmung in einen großen auf 40^{0} angeheizten Thermostaten überführen. Einen Fehler habe ich damit kaum gemacht, da mir ja immer nur an Vergleichswerten gelegen war und ich z. B. exakte Zeitmessung wie bei Labversuchen mit Kuhmilch gar nicht machen wollte. Für meine Zwecke war es nur wichtig, daß das ganze Gestell gleichzeitig in den Heizraum kam.

Beurteilung der Fällungsreaktion.

Für die Beurteilung des Reaktionserfolges ist die Darlegung einiger allgemeiner Eigentümlichkeiten der Frauenmilchfällung

nötig, wenn ich mich im nachfolgenden Teile verständlich machen soll. Die Frauenmilch erstarrt ja unter keinen Umständen zu einem auch nur annähernd so festen Gerinnsel, wie man es in der Kuhmilch leicht erzeugen kann; es entstehen immer mehr oder minder große Flocken, welche sich dann von dem rückbleibenden Plasma absetzen, gelegentlich auch ein mehr gleichartiges, leicht verteilbares Gerinnsel. Es hat sich nun im Laufe der Untersuchung gezeigt, daß die Flockenbildung nach zwei Gesichtspunkten betrachtet werden muß, nämlich nach der Schnelligkeit, mit der sie auftritt, und nach der Größe der Flocken, welche sich bilden. Im allgemeinen ist es nun so, daß Schnelligkeit und Energie der Flockenbildung im hohen Maße zusammenfallen. Treten die ersten Gerinnsel (immer im durchfallenden Lichte betrachtet) frühzeitig auf, so kann man auch rechnen, daß sie schnell zu größeren Komplexen zusammenfließen werden. Die Bewertung dieser Erscheinung liegt nicht ganz klar auf der Hand. Es wäre nämlich verfehlt, anzunehmen, daß mit schneller und energischer Flockenbildung auch eine hohe Vollständigkeit des Endresultates Hand in Hand gehen müßte. Das ist ganz und gar nicht der Fall. Im Gegenteil, eine langsamere und feinere Ausfällung zeitigt oftmals ein besseres Ergebnis insofern, als das Plasma nach der Sedimentierung klarer wird, wie in solchen Fällen, wo es schnell zur Bildung gröberer Gerinnsel kommt.

Es ist daher zweckmäßig, im Verfolge der Reaktionserscheinung zwei Stadien zu unterscheiden:

1. ein Frühstadium, welches ungefähr die ersten 15 Minuten umfaßt, und in dem man die Röhrchen notieren muß, in denen zuerst und in welcher Art Flöckchen auftreten,

2. ein Spätstadium, frühestens nach Ablauf der ersten Stunde, innerhalb deren sich die Trennung von Gerinnsel und Plasma vollzogen hat, in dem man den Endeffekt der Reaktion aus der Höhe der Caseinsäule und der gleichsinnigen Trübung des Plasma erkennen kann.

Innerhalb des Frühstadiums kann man Abstufungen derart festlegen, daß man die Flockengröße[1]) in Rechnung zieht. In

[1]) Mikroskopisch sichtbare oder staubförmige, im durchfallenden Licht nicht erkennbare Gerinnsel wurden nicht notiert.

den Tabellen werden diese Unterschiede durch eine steigende Zahl von Kreuzen zum Ausdruck gebracht, um einen leichten Überblick zu verschaffen, und zwar sind sie im allgemeinen so zu verstehen, daß

+	bedeutet:	feinflockig,
++	„	mittelflockig,
+++	„	grobflockig,
++++ und mehr	„	noch stärkere Grade des grobflockigen.

Ich verkenne natürlich nicht, daß diese Bezeichnungen sehr subjektiv und im allgemeinen nur innerhalb jeder einzelnen Reihe vergleichbar sind.

Etwas objektiver zu beurteilen ist das Endresultat, wo ja die Säule des Gerinnsels und die Dichtigkeit der Plasmatrübung eher einer Messung zugängig sind. Die verschiedenen Grade sind hier durch senkrechte Striche in den Tabellen gekennzeichnet, so daß der größten Zahl von Strichen die stärkste Wirkung (das klarste Plasma) entspricht. Die größere Objektivität dieser Beurteilung ist um so bedeutungsvoller, weil ja doch schließlich das Endresultat am wichtigsten ist. Wo es daher nicht gerade auf Schnelligkeitsunterschiede in der Fällung besonders ankommt, werde ich mich im allgemeinen mit der Darstellung des endgültigen Ergebnisses zufrieden geben.

Bezüglich der morphologischen Vorgänge bei der Frauenmilchfällung sei noch darauf hingewiesen, daß die Flocken durch ihren starken Fettgehalt nach oben gerissen werden, so daß sich nicht ein Sediment bildet, sondern ein Deckengerinnsel, wie ich es kurz nennen will. Nur wenn man es mit Magermilch zu tun hat, sinken die Flocken größtenteils zu Boden.

Säurewirkung.

Wir wollen zunächst den einfachsten Fall betrachten, nämlich, daß bei irgendeiner Milch von bestimmtem Fettgehalt und bestimmter Acidität, etwa der gewöhnlichen von 4 bis 5, das Optimum der Säurewirkung festgestellt werden soll. Es werden eine Reihe von Röhrchen mit je 1 ccm Milch beschickt, steigende Mengen $^{n}/_{10}$-Salzsäure zugefügt, mit destilliertem Wasser aufgefüllt und das Gestell in den Brutofen gebracht. Das

Resultat, das in einem solchen Falle erhalten wird, ist in der Tabelle I dargestellt.

Tabelle I.

Versuch C vom 12. 6. 08.
Titration gegen steigende Salzsäure.
Milch { Fettgehalt 5,7. / Acidität 4,0.

$^n/_{10}$-Salzsäure	5′	15′	1 Std.	Bemerkungen
0,0	—	—	—	
0,1	—	—	—	
0,2	+ +	+ +	| | |	
0,3	+	| | | | |	| | | | |	Plasma fast wasserhell
0,4	—	+	|	
0,5	—	—	—	

Dieses Versuchsergebnis ist durchaus typisch (s. a. Taf. 1, ob. Reihe):

Schon nach 5 Minuten erhält man in dem Röhrchen, in dem sich 0,2 $^n/_{10}$-Salzsäure befinden, eine mittelflockige, im nächsten eine feinflockige Gerinnung.

Nach 15 Minuten ist sie im ersten Röhrchen immer noch mittelflockig, während sich im darauffolgenden schon eine starke Sedimentierung vollzogen hat.

Nach einer Stunde ist das Ergebnis im ganzen gleich geblieben, die beiden genannten Röhrchen haben sich sedimentiert, auch im 4. Röhrchen ist noch ein schwaches Deckengerinnsel aufgetreten, alle anderen sind freigeblieben. Im Röhrchen 4 ist Deckengerinnsel und Plasmahelligkeit, so wie es die Zahl der Striche darstellt, ganz unverhältnismäßig viel stärker wie in anderen Röhrchen.

Man muß das Urteil in diesem Falle also dahin zusammenfassen, daß die optimale Säurewirkung bei einer Acidität von 3 ccm $^n/_{10}$-Säure auf 10 ccm Milch eingetreten ist und daß die Fällungserscheinung in allen anderen Röhrchen neben der Stärke in diesem gar nicht zur Geltung kommt.

Dieser Befund, welcher, wie schon gesagt, durchaus typisch

ist und sich immer und immer wiederholt, kann gar nicht genug hervorgehoben werden. Er demonstriert uns die Abhängigkeit der Frauenmilchgerinnung von einem so eng begrenzten Säureoptimum, daß wir nicht erstaunen können, wenn immer wieder von neuem Mißerfolge erzielt wurden beim Bestreben, Frauenmilch zur Säuregerinnung zu bringen. Wenn man nicht, wie es hier geschehen ist, dazu übergeht, die benötigte Acidität gewissermaßen auszutitrieren, so ist man natürlich ganz dem Zufall anheimgegeben, ob man gelegentlich einen Erfolg erzielt oder nicht. Wenn man immer wieder von neuem gleichgeartete Versuche anstellt, so kommt man schließlich zur Erkenntnis, daß das Optimum der Säurewirkung für die Salzsäure wenigstens, so wie es auch Bienenfeld für die Milchsäure angegeben hat, zwischen 2 und 3 ccm $^{n}/_{10}$-Säure für 10 ccm Milch liegt.

Will man noch eindringlicher die feine Abstimmung der Frauenmilchgerinnung von einem Bestmaß an Säure sich vor Augen führen, so muß man mit noch stärker verdünnten Säuren arbeiten, etwa wie es in dem in Tabelle 2 dargestellten Falle

Tabelle II. (S. a. Taf. 1 Fig. 2.)

Versuch g vom 30. 6. 08.

Titration gegen steigende $^{n}/_{50}$-Salzsäure.

Milch { Fettgehalt 5,3. / Acidität 3,0.

<table>
<tr><th>$^{n}/_{50}$-Salzsäure</th><th>5′</th><th>10′</th><th>1 Std.</th><th>Bemerkungen</th></tr>
<tr><td>0,0</td><td>—</td><td>—</td><td>—</td><td></td></tr>
<tr><td>0,2</td><td>—</td><td>—</td><td>—</td><td></td></tr>
<tr><td>0,4</td><td>—</td><td>—</td><td>—</td><td></td></tr>
<tr><td>0,6</td><td>—</td><td>—</td><td>—</td><td></td></tr>
<tr><td>0,8</td><td>—</td><td>—</td><td>|</td><td></td></tr>
<tr><td>1,0</td><td>+ + + +</td><td>| | | | |</td><td>| | | | | |</td><td>Plasma leicht trüb</td></tr>
<tr><td>1,2</td><td>+</td><td>| |</td><td>| | |</td><td></td></tr>
<tr><td>1,4</td><td>—</td><td>|</td><td>| |</td><td></td></tr>
<tr><td>1,6</td><td>—</td><td>—</td><td>|</td><td></td></tr>
<tr><td>1,8</td><td>—</td><td>—</td><td>|</td><td></td></tr>
<tr><td>2,0</td><td>—</td><td>—</td><td>—</td><td></td></tr>
</table>

geschehen ist mit $^{n}/_{50}$-Säure. Da sieht man, daß zwischen dem einen Röhrchen, welches noch gar keine Veränderung zeigt, und

dem nächstfolgenden, wo die Fällung ein beinahe wasserklares Plasma erzielt (s. a. Taf. 1, Fig. 2), ein Unterschied von nur 0,2 ccm der $^{n}/_{50}$-Säure vorhanden ist, was also 0,04 ccm einer $^{n}/_{10}$-Säure entspricht, eine Menge, welche man, in der letzteren Konzentration wenigstens, mit den üblichen Auslaufpipetten kaum mehr messen kann. Daß in diesem Falle eine größere Zahl von nachfolgenden Röhrchen eine wenn auch nur geringe Ausflockung zeigt, kann beim Vergleiche mit der Tabelle 1, wo es sich um $^{n}/_{10}$-Säure handelt, nicht wundernehmen, da ja ein Röhrchen der Tabelle 1 $2^{1}/_{2}$ Röhrchen der Tabelle 5 entspricht, wenn man die graduelle Anreicherung an Säure zum Maßstab nimmt.

Es entsteht nun die weitere Frage, ob etwaige Einflüsse das Säureoptimum nach oben oder unten verschieben können.

Hier muß vorweg genommen werden, daß, wenn man mit einer bestimmten Säure arbeitet, es im allgemeinen gleichgültig ist, ob man es mit einer gut oder schlecht gerinnenden Frauenmilch zu tun hat, ob man z. B. ein ganz frisches Sekret oder ob man Eismilch benutzt.

Es ergeben sich dann wohl Unterschiede hinsichtlich der Schnelligkeit und der Vollständigkeit der Ausflockung, auch nehmen vielleicht einige Röhrchen mehr am Prozeß teil, niemals aber verschiebt sich das Optimum irgendwie wesentlich, weder nach oben noch nach unten; auch an der Tatsache ändert sich nichts, daß die wirklich optimale Wirkung auf eine ganz bestimmte Acidität streng begrenzt bleibt.

Nun könnte man noch weiter fragen, ob sich die geschilderten Verhältnisse nicht etwa allein auf die Salzsäure beziehen oder höchstens noch auf die Milchsäure, mit der Bienenfeld ihre Versuche angestellt hatte. Tatsächlich macht es im allgemeinen kaum etwas aus, welche Säure man benutzt. Ich habe außer der Salzsäure noch die Milch-, Oxal- und Schwefelsäure geprüft, also Vertreter der organischen und der anorganischen Säuren, und habe im wesentlichen immer das gleiche gefunden, nämlich: daß das Optimum der Säurewirkung allein immer wieder zwischen 2 und 3 ccm $^{n}/_{10}$-Säure auf 10 ccm Milch liegt.

Ich verzichte darauf, die immer gleichlautenden Protokolle hier aufzuführen.

Eine bemerkenswerte Ausnahme von allen geprüften Reagentien bilden nur die Phosphor- und die Essigsäure. Diesen beiden ist gemeinsam, daß ihr Wirkungsoptimum längst nicht so scharf umgrenzt ist wie bei den obengenannten Säuren, daß ein günstigstes Aciditätsverhältnis zwar auch hier besteht, daß aber auch diesseits und jenseits davon noch eine gute Fällung erzielt werden kann. Charakteristisch ist auch noch für die beiden Säuren, daß man für die beste Fällung im ganzen größere Mengen gebraucht wie bei der erstgenannten Gruppe, die ich nach ihrem physiologisch wichtigsten Vertreter die „Salzsäuregruppe" nennen will. In den Details differieren beide Säuren noch so weit, daß eine getrennte Besprechung angemessen erscheint.

Phosphorsäure.

Die Tabelle III zeigt, daß die beste Wirkung diesmal erst bei einer Acidität von etwa 5 ccm $^{n}/_{10}$-Säure auftritt, daß

Tabelle III.

Versuch 47 vom 10. 6. 08.
Titration gegen steigende $^{n}/_{10}$-Phosphorsäure.
Milch { Fettgehalt 5,0. Acidität 6,0.

$^{n}/_{10}$-Phosphors.	5′	10′	1 Std.	Bemerkungen
0,0	—	—	—	
0,1	—	—	—	
0,2	+	+	|	
0,3	+ + +	+ +	| | |	
0,5	+	+ + + +	| | | | |	Plasma wasserhell
0,7	—	+	| | |	
0,9	—	+	| |	
1,1	—	—	|	
1,3	—	—	|	

aber auch noch vor und nachher eine nicht scharf abstechende Wirkung zu beobachten ist. In Versuch 47, wo es sich um eine im ganzen leicht gerinnende Milch handelte, trat eine wenn auch schwächere Flockung besonders noch in den Röhrchen höherer Konzentration ein. Ganz frei blieb nur das ungesäuerte Kontrollröhrchen und das darauffolgende mit 0,1 Phosphorsäure.

Essigsäure.

Die Essigsäure verhält sich nun ganz abnorm. Hier ist die Unabhängigkeit der Fällung von einem ganz engbegrenzten Optimum noch offenkundiger wie bei der Phosphorsäure. Gemeinsam mit dieser hat sie, daß die Wirkung überhaupt erst bei relativ hohen Aciditätswerten eintritt, bei Werten, wo bei den Säuren der HCl-Gruppe im allgemeinen das Optimum schon erreicht oder überschritten ist. Die Intensität der

Tabelle IV. (S. a. Taf. 1, Fig. 3.)

Versuch 1 vom 30. 6. 08.

Titration gegen steigende $^n/_{10}$-Essigsäure.

Milch { Fettgehalt 5,3. Acidität 3,0.

$^n/_{10}$-Essigs.	5′	10′	1 Std.	Bemerkungen
0,0	—	—	—	
0,1	—	—	—	
0,2	—	—	—	
0,3	—	+	|	
0,4	+	+ +	| |	
0,5	+	+ +	| | |	
0,6	+	+ +	| | | |	
0,8	+ + +	+ + + + + +	| | | |	
1,0	+ +	+ + +	| | | | |	
1,2	+	+ +	| | | | |	
1,4	+	+	| | | |	
1,6	—	—	| | | |	

Reaktion steigt ganz schnell an, erreicht aber ein wirklich genau abgrenzbares Optimum überhaupt nicht. Bei einer Acidität von 5 bis 12 auf 10 ccm Milch pflegt ein breites Plateau optimaler Ausflockung erreicht zu werden. Hier muß man auch wieder, wie Tabelle IV lehrt, die Früh- und Spätperiode der Gerinnung beachten, weil auch hier wieder der stärkste Endeffekt nicht denjenigen Röhrchen zukommt, in denen die Flocken am schnellsten sichtbar wurden. Jenseits des optimalen Plateaus klingt dann die Säurewirkung langsam ab, gibt aber noch bei etwa 16 ccm auf 10 ccm Milch eine wenn auch geringere Fällung.

Fasse ich nun noch einmal zusammen, so muß ich die

Einwirkung von Säure allein auf 5fach verdünnte Frauenmilch folgendermaßen charakterisieren:

Eine Gruppe von Säuren, die ich nach ihrem physiologisch wichtigsten Vertreter kurz die Salzsäuregruppe nenne, fällt das Casein der Frauenmilch (je nach dem Grunde der Gerinnungsfähigkeit der betr. Milchsorte) mehr oder minder vollkommen bei einem außerordentlich engumgrenzten Aciditätsoptimum, das etwa bei 2 bis 3 ccm $^{n}/_{10}$-Säure für 10 ccm Milch liegt. Dieses Bestmaß ist so scharf umgrenzt, daß bei Proben von 1 ccm Frauenmilch der Aciditätsunterschied zwischen negativer und bester Reaktion nicht mehr wie 0,2 einer $^{n}/_{50}$- oder 0,04 einer $^{n}/_{10}$-Säure beträgt. Bis etwa zum doppelten Grade der otpimalen Acidität folgt dann noch eine immer mehr und mehr abnehmende Wirkung, die aber im Vergleich zur optimalen als minimal bezeichnet werden muß. Kurz gesagt heißt das, daß die Fällbarkeit der Frauenmilch bei den Vertretern der Salzsäuregruppe aufs allerengste an ein Optimum gebunden ist. Beachtet man diesen Umstand nicht, so erhält man gar kein oder doch nur ein sehr geringes Resultat. Ich betone vor allen Dingen das Monopol der optimalen Säurewirkung, weil ein Optimum sich ja auch schließlich so bilden kann, daß es den höchsten Punkt einer ansteigenden und dann wieder abfallenden Linie bildet. So ist es aber bei der HCl-Gruppe nicht. Weder vor noch nach dem beiden Aciditätsgrad tritt irgendwelche nennenswerte Fällung auf. Man kann also nicht erwarten, eine nur weniger schwächere Reaktion zu erhalten, wenn man etwas von jenem Optimum abweicht, sondern es tritt dann überhaupt nichts ein.

Demgegenüber zeichnen sich die Phosphor- und Essigsäure[1]) dadurch aus, daß ihre Wirkung und besonders die von der letztgenannten längst nicht so

[1]) Gelegentlich einer Unterredung in Berlin wurde ich von Herrn Dr. Fuld darauf aufmerksam gemacht, daß die Verschiedenheit der Wirksamkeit der einzelnen Säuren zu ihrer Stärke in Beziehung stehen könnte. Diese sehr wahrscheinliche Annahme bedarf noch des eingehenden Beweises.

eng an einen bestimmten Säuregrad gebunden ist, und daß man im allgemeinen sehr viel höhere Konzentrationen notwendig hat, wenn man Fällung erzielen will. Zweckmäßig wird man sich daher zur Caseindarstellung der Essigsäurefällung bedienen, weil alsdann die Dosierung gar so genau nicht zu sein braucht.[1])

Kombinierte Säure- und Labwirkung.

Wir kommen nun zu der zweiten uns hier beschäftigenden Frage, die von erheblich größerem physiologischem Interesse ist. Ob nämlich ein Unterschied zwischen der isolierten Säure- und der kombinierten Säurelabwirkung vorhanden ist. Ich hatte schon oben erwähnt, daß eine derartige Differenz von Bienenfeld geleugnet wird und daß ihr gegenüber Fuld und Wohlgemut betonen, daß entsprechend vorbehandelte Frauenmilch sich laben lasse. Im selben Sinne haben sich neuerdings auch Kreidl und Neumann ausgesprochen, die mit Hilfe des Ultramikroskopes die Milchgerinnung direkt mit dem Auge betrachtet haben.

Geht man auf die Frage ein, so zeigt sich bald, daß sie so einfach nicht abzutun ist, daß man sie von den verschiedensten Seiten angehen muß, um Klarheit zu erreichen. Ein gangbarer Weg wäre zunächst, festzustellen, ob nicht auch in der Frauenmilch bei der Fällung durch Lab ein andersartiges Produkt entstände wie bei der Ausflockung mit Säure allein. Diesen Weg versuchte Bienenfeld zu geben, indem sie die N-Verteilung in Molke und Gerinnsel als Kriterium benützte. Einfacher und eindeutiger scheint die Beantwortung der Frage möglich zu sein, ob nicht ebenso wie bei der Kuhmilch die Labwirkung im Gegensatz zu der der Säure allein eine kalkhaltige Caseinverbindung, das Paracasein, hervorbringt. Bis zu einem gewissen Grade kann man die Richtigkeit dieser Annahme schon aus dem von Fuld und Wohlgemut erhobenen Befunde schliessen, daß ihre leicht gerinnende und gelabte Eismilch durch Zusatz von Chlorcalcium zum Ausflocken gebracht wurde. Diese Angabe gestattet aber keinen Vergleich mit der Wirkung, welche etwa an derselben Milch beim Zusatz von Säure allein

---

[1]) Eine hierauf gegründete äußerst einfache Methode der Caseindarstellung aus nativer Frauenmilch wird demnächst veröffentlicht.

eingetreten wäre. Mir kam es aber vor allen Dingen darauf an zu sehen, was bei der Verwendung eines physiologischen Labgemisches entstünde. Es hat sich nun gezeigt, daß die sofort noch näher zu besprechenden Vorzüge der Säurelabwirkung nur dann eintreten, wenn hinreichende Mengen von Kalk vorhanden sind. Die Frauenmilch allein enthält anscheinend nicht genug davon, aber jeder auch noch so minimale Zusatz ruft die volle Überlegenheit der gemeinsamen Säurelabwirkung hervor. Wenn man z. B. Reihen anstellt, die mit gleichen Mengen steigender Säure versetzt werden, wo aber in dem einen Falle noch einige Tropfen einer Lablösung zugefügt werden, im entsprechenden aber nicht, so erzielt man eine nur ganz geringe Überlegenheit der Labwirkung, wenn man die Milchverdünnug mit destilliertem Wasser vornimmt. G a n z e n e r g i s c h w i r d s i e a b e r s o f o r t, w e n n m a n n u r z u m s e l b e n Z w e c k e L e i t u n g s w a s s e r b e n ü t z t. Noch exakter kann man natürlich den Einfluß des Kalkes gerade auf die Säurelabwirkung demonstrieren, wenn man einige Tropfen einer Kalksalzlösung zufügt. Es ist wohl unnötig zu betonen, daß umgekehrt bei Säurewirkung allein der Zusatz von Kalk, wenn auch nur in der Form der Verdünnung mit Leitungswasser, eher hemmend wie fördernd wirkt.

Ist es nun gestattet aus dieser Verschiedenheit des Einflusses, welchen der Kalk auf die Säure- bzw. Säurelabfällung ausübt, den Schluß zu ziehen, daß in Analogie mit der Kuhmilch in einem Falle Casein, in dem anderen Falle Paracasein gebildet wird, so wäre damit auch schon gesagt, daß die Einwirkungen im beiderlei Sinne als prinzipiell verschiedener Natur zu deuten sind, daß also schon die Natur der Endprodukte es nicht gestatten würde, die Säurelabwirkung als Säureeffekt aufzufassen, ganz abgesehen von den bald zu besprechenden weiteren Unterschieden, welche obwalten. Für diejenigen, welche Casein zu analytischen Zwecken darstellen wollen, resultiert daraus jedoch jetzt schon die Mahnung, sich gegenwärtig zu halten, daß sie Lab nicht verwenden dürfen, falls sie Casein im engeren Sinne des Wortes gewinnen wollen.

Studiert man nun den Mechanismus der Säure- bzw. Säurelabwirkung etwas eingehender, so kommt man zu Resul-

taten, welche für die Verdauungsphysiologie des Säuglings nicht ohne Interesse sind.

Die Methodik der Untersuchung ist am besten auch hier wieder so, daß man ähnliche Reihen anstellt wie bei der Erforschung des Säureeinflusses allein, daß man in genau entsprechenden Parallelreihen gleichzeitig Lab zusetzt bzw. fortläßt. Auf diese Weise kann man am besten erkennen, ob der Gang der Säurefällung durch das Lab beeinflußt wird. Nur hierum kann es sich bei dem Einfluß des Fermentes ja handeln, nachdem festgestellt wurde, daß Lab ohne Säure wirkungslos bleibt. In manchen Fällen ist es auch angemessen, in einer Reihe immer zwei gleiche Röhrchen nebeneinander zu stellen, von denen das eine dem anderen gegenüber nur durch den Labzusatz ausgezeichnet ist. Unter allen Umständen sieht man, wie man die Anordnung auch trifft, ganz grobe und abweichende Erscheinungen in den Labröhrchen[1]) auftreten, falls man ihnen notabene den nötigen Kalk durch Verdünnung mit Leitungswasser zugeführt hat. Das erzielte Resultat läßt sich ganz kurz dahin charakterisieren, daß in den Labröhrchen

1. die Fällung meist schneller vor sich geht,
2. die Flockung in einer größeren Zahl von Röhrchen auftritt.

Keineswegs soll mit dieser Feststellung jedoch gesagt sein, daß man die Säurelabfällung als die bessere, die kräftigere betrachten muß. Wenn es überhaupt gestattet ist, derartige Urteile zu fällen, so ist es in diesem Falle dadurch erschwert, daß Schnelligkeit und größerer Umfang der Fällungserscheinungen bis zu einem gewissen Grade wieder dadurch ausgeglichen werden, daß der Endeffekt in den schnell fällenden Röhrchen in der Regel kleiner ist als in den entsprechenden mit langsamer Reaktion. Auf dieses Wechselverhältnis, welches bei allen Gerinnungsvorgängen der Milch zutage tritt, habe ich ja bereits mehrfach hingewiesen.

Was den ersten Punkt, die Schnelligkeit der Gerinnung, betrifft, so sind die entsprechenden Unterlagen aus den Protokollen in Gestalt eines typischen Beispieles in Tabelle 5 niedergelegt.

---

[1]) Proben mit gekochter Lablösung wiesen darauf hin, daß das Ferment wirklich das wirksame Agens war.

Tabelle V. (S. a. Fig. 1 und Taf. 1, Fig. 1.)

Versuch A 5 vom 10. 7. 08.

Titration gegen steigende n/10-Salzsäure mit und ohne Lab.[1])

Milch { Fettgehalt 3,9.
Acidität 14.

<table>
<tr><th rowspan="2">n/10-Salzs.</th><th colspan="2">5′</th><th colspan="2">10′</th><th colspan="2">20′</th><th colspan="2">2 Std.</th><th rowspan="2">Bemerkungen</th></tr>
<tr><th>ohne Lab.</th><th>mit Lab.</th><th>ohne Lab.</th><th>mit Lab.</th><th>ohne Lab.</th><th>mit Lab.</th><th>ohne Lab.</th><th>mit Lab.</th></tr>
<tr><td>0,0</td><td>—</td><td>—</td><td>—</td><td></td><td>—</td><td>—</td><td>—</td><td>—</td><td></td></tr>
<tr><td>0,1</td><td>—</td><td>+</td><td>—</td><td>++</td><td>—</td><td>|||</td><td>|||</td><td>||</td><td></td></tr>
<tr><td>0,2</td><td>—</td><td>+++</td><td>++</td><td>+++||</td><td>||||</td><td>||||</td><td>||||||</td><td>||||</td><td></td></tr>
<tr><td>0,3</td><td>—</td><td>++</td><td>—</td><td>+++</td><td>—</td><td>|||||</td><td>—</td><td>|||||</td><td></td></tr>
<tr><td>0,4</td><td>—</td><td>—</td><td>—</td><td>—</td><td>—</td><td>—</td><td>—</td><td>||||</td><td></td></tr>
<tr><td>0,5</td><td>—</td><td>—</td><td>—</td><td>—</td><td>—</td><td>—</td><td>—</td><td>||</td><td></td></tr>
</table>

Man kann hier deutlich erkennen, daß zu einer Zeit, wo die Säureröhrchen im durchfallenden Licht noch ganz homogen erschienen, in den Labröhrchen schon Flocken sichtbar waren, und daß im weiteren Verlaufe die Intensität der Flockenbildung auch weiter zeitlich in den Labröhrchen voranging. Die Energie der schnellen Fällung trat besonders bei solcher Milch deutlich zutage, welche etwa durch Kälte in einen Zustand leichter Gerinnbarkeit versetzt worden war. Hier sah man die ersten Gerinnungserscheinungen oftmals schon binnen wenigen Minuten und bei Zimmertemperatur. In frischer Milch vollzieht sich die Fällung nach Zeit und Intensität etwas anders. Hierauf komme ich in einem späteren Artikel zurück, indem ich den Einfluß gleichbleibender Fällungsreaktion auf verschiedene Milcharten zeigen werde.

Der Kernpunkt der Befunde liegt aber nicht in der Schnelligkeit, nicht in der Stärke der Labfällung, sondern darin, daß in einer größeren Zahl von Röhrchen beachtliche Gerinnung eintritt, d. h. also daß eine nennenswerte Gerinnung nicht nur einer optimalen Acidität zukommt, sondern auch den benachbarten Säurewerten. Es stellen sich so Verhältnisse heraus, wie man sie unbeeinflußt durch das Ferment nur bei der Phosphor- und Essigsäure sonst antrifft. Damit soll nicht gesagt sein, daß

[1]) 0,2 ccm einer käuflichen Labessenz (Simon-Apotheke-Berlin).

das Gesetz von der optimalen Säurewirkung etwa seine Geltung verlöre; soweit erstreckt sich der nivellierende Einfluß der Labwirkung meist nicht. Während jedoch, bildlich gedacht, bei der Säurewirkung die optimale Fällung gewissermaßen allein wie eine isolierte Zacke aus dem Niveau hervorragt, spitz wie ein Obelisk, so erhebt sie sich im Falle der kombinierten Säurelabwirkung nur mehr relativ niedrig aus einem breiten Plateau. Um diese Tatsache besser zu illustrieren, habe ich in Fig. 1 das Endresultat eines Versuches mit Salzsäure und mit Salz-

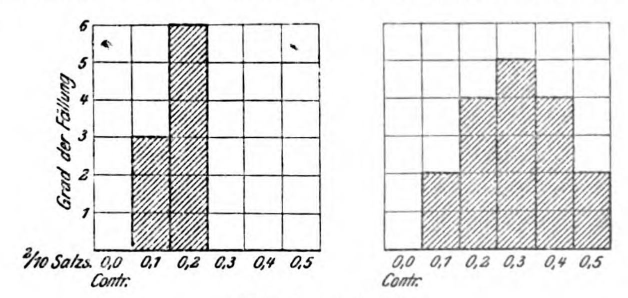


Fig. 1a und 1b.
Graphische Darstellung des Fällungsresultates aus Tabelle V. (Säure- und Säurelabwirkung.)

säure und Lab in graphische Form so gebracht, daß ich für jedes Röhrchen der Reihen das Fällungsresultat je nach der Zahl der |-Striche als Säule aufgebaut habe. Da ergibt sich mit fundamentaler Deutlichkeit, was soeben geschildert wurde, die isolierte Spitze (a) auf der einen Seite, das Plateau mit der nur wenig hervorragenden Höchsterhebung (b) auf der anderen Seite. Vergleicht man die beiden miteinander, die, weil gleichzeitig aufgenommen, tatsächlich untereinander vergleichbar sind und bei der Bewertung verglichen wurden, so zeigt sich wiederum, daß die optimale Fällung bei der Säurewirkung allein besser ist wie nach dem Hinzutreten des Fermentes; eine Tatsache, die ihre Erklärung in den mehrfach berührten Wechselbeziehungen zwischen Schnelligkeit und Vollständigkeit der Reaktion findet.[1])

[1]) Wenn Kreidl und Naumann sagen: „Auf eine bestimmte Acidität gebracht und innerhalb einer gewissen Breite derselben, tritt in der Frauenmilch bei Labzusatz Ausflockung ein, während Frauenmilchproben von derselben Acidität ohne Lab nicht gerinnen. Säurefällung

Wenn man nun versucht, sich über das Wesen und die Bedeutung der dargelegten Unterschiede klar zu werden, so scheint es mir unter allen Umständen am wichtigsten zu sein, daß durch die Hinzufügung von Labferment gewissermaßen das starre Monopol, welches bei der Säurewirkung einer so engbegrenzten Acidität zukommt, durchbrochen wird. Das Ferment emanzipiert die Säure von einem in physiologischer Beziehung sicherlich ungemein lästigen Gesetze. Wenn man sich vorstellen wollte, daß der Magen des Säuglings z. B. nur Salzsäure und kein Labenzym sezernierte, so müßte er sicherlich sich auf eine solche Absonderung einstellen, daß immer im Magen das für die Ausfällung nötige Aciditätsoptimum herrscht.

Voraussetzung wäre allerdings, daß man die Gerinnung der Milch als einen für die Magenverdauung und für die Verarbeitung der Milch überhaupt nützlichen und notwendigen

---

erfolgt erst bei höherer Acidität," so trifft das, wie man aus meinen Ausführungen sieht, nicht den Kern des Unterschiedes zwischen Säure- bzw. Säurelabgewinnung. Nicht höhere Acidität erfordert die Abwesenheit des Labs, sondern eine bestimmte Acidität (Optimum). Der Labzusatz zur Frauenmilch bewirkt nicht nur, daß bei niederen, sondern auch bei höheren Säurewerten, wo sonst keine Flockung bei reiner Säurewirkung mehr eintritt, nun doch noch eine Gerinnung erfolgt. Nur bei ganz schlechten Gerinnungsbedingungen (mangelnde Verdünnung usw.) zeigt sich der Fermenteffekt nur vor dem Aciditätsoptimum. Während der Drucklegung erhielt ich durch die Güte des Herrn Prof. Kreidl Separata aller seiner Mitteilungen, während sich die Anmerkung bisher nur auf den Artikel im „Centralbl. f. Physiol." bezog. Namentlich die Ausführungen in der „Zeitschr. f. Biolog." haben mich nun belehrt, daß die Differenzen zwischen beiden Anschauungen weniger prinzipieller wie gradueller Natur sind, und ihren Grund teilweise in der Methodik haben. Kreidl, der die Frage der Frauenmilchlabung im Reagensglas nur nebenbei prüfte, brachte in seinen Reihen die Acidität überhaupt nur bis an das Optimum (2,4 auf 10) heran, so daß die jenseits liegenden Erscheinungen ihm gar nicht zu Gesicht kommen konnten. Außerdem arbeiteten Kreidl und Neumann anscheinend mit unverdünnter Milch und mit relativ geringen Labmengen. Der letzte Punkt ist besonders nicht ohne Einfluß. Auch in der Beurteilung der Proben sind insofern Differenzen, als ich erst die im durchfallenden Licht sichtbaren Flocken beachtete und mich weniger von den zeitlichen Vorgängen leiten ließ als von dem Endeffekt, der erst nach völliger Scheidung von Gerinnsel und Plasma beurteilt wurde.

Vorgang auffaßte, woran allerdings kaum gezweifelt werden kann. Da wir andererseits mit Sicherheit wissen, daß Störungen der Salzsäureproduktion etwas durchaus Alltägliches sind, so müßte es — immer unter Zugrundelegung jener Annahme — häufig dazu kommen, daß die optimale Säurekonzentration nicht vorhanden wäre und infolgedessen die Milch gar keinen oder nur einen unvollkommenen Gerinnungsprozeß durchmachen würde. Ich glaube nicht fehlzugehen, wenn ich einen Teil der Bedeutung der Labwirkung gerade für den Säugling darin zu erblicken glaube, daß er voraussichtlich den Organismus, ebenso wie es im Reagensglase geschieht, von diesem lästigen Monopole eines für die Milchgerinnung engbegrenzten Aciditätsoptimums freimacht und dadurch die Gerinnung der Milch und damit ihren physiologischen Abbau innerhalb eines gewissen Spielraumes für die Salzsäureerzeugung gewährleistet. Soweit können wir uns die Bedeutung des Fermentes schon heute nach dem Stande unserer Kenntnis von der Milchverdauung klarmachen. Ein zweiter Punkt, auf den ich oben wenigstens kurz eingegangen bin, darf eigentlich nicht vernachlässigt werden, wenn auch das Wesen seiner Bedeutung nicht ohne weiteres offenbar ist. Man darf nämlich nicht vergessen, daß ja doch als Endprodukt der Säure- bzw. der Labsäuregerinnung zwei wenn auch eng verwandte so doch immerhin verschiedenartige Körper nämlich Casein und Paracasein, entstehen. Es bedarf noch dringend der Aufklärung, welche Unterschiede etwa in der Verdauung der beiden obwalten, aber schon heute kann doch wenigstens gemutmaßt werden, daß die Differenz so ganz belanglos nicht sein kann.[1])

Wenn auch physiologisch minder wichtig, so doch theoretisch nicht ohne Interesse ist die Frage, welche Einwirkung das Lab auf die durch Phosphor- und Essigsäure erzeugte Gerinnung hat, die ja an sich schon, wie ich vorhin bereits erwähnte, ähnliche Fällungsresultate geben, wie von Säuren der HCl-Gruppe im Verein mit dem Ferment. Nun, wenn die Eigentümlickeit der kombinierten Fermentwirkung bei diesen

[1]) Sicher darf man wohl annehmen, daß wie im Reagensglas so auch im Säuglingsmagen die Labwirkung auch tatsächlich eintritt; Kreidl und Neumann halten das auch für wahrscheinlich.

darin besteht, daß das Monopol des Säureoptimums weitgehend gebrochen wird, so ist es klar, daß bei jenen, wo ein solches überhaupt nicht existiert, das Wesen der mit Säuerung kombinierten Labung nicht genau das gleiche sein kann. Im Prinzip ist allerdings kein Unterschied vorhanden. Auch hier wieder tritt Nivellierung der Säurewirkung ein in dem Sinne, daß die Modalitäten, welche sonst durch die Konzentration bedingt werden, bis zu einem gewissen Grade durch die Anwesenheit des Enzyms ausgeglichen sind. Sowohl bei geringerer, wie bei stärkerer Acidität erfolgt noch eine Fällung. Die Kurve der Endresultate in einer Reihe, die ich mir allerdings erspart habe, darzustellen, die sich aber nach der Art der Figur 1a und b leicht bewerkstelligen ließe, würde nicht in der Art eines mehr oder minder spitz zulaufenden Gipfels, sondern wiederum eher nach der eines breiten Hochplateaus verlaufen.

Wenn ich nun hier mit dieser Abhandlung schließe, so geschieht es in dem Bewußtsein, daß ich eine große Zahl von Fragen angeschnitten habe, praktischer wie theoretischer Natur, die noch der Bearbeitung, sei es mit Hilfe des Reagensglasversuchs des Tierexperiments, oder der klinischen Beobachtung, bedürfen. So sei z. B. nur darauf hingewiesen, daß die Besonderheit der Essigsäurefällung, die Überlegenheit des Endeffektes bei der isolierten und optimalen Säurewirkung für die Darstellung des Caseins zu Zwecken der Analyse, sicherlich beachtet werden müssen, und daß sie den Weg weisen zur Ausarbeitung einer sicheren Methodik der Caseindarstellung aus Frauenmilch. Einige dieser Fragen sind bereits von mir in Angriff genommen worden und werde ich wohl bald Gelegenheit haben, über das Ergebnis zu berichten. Ich glaubte jedoch diesen Teil meiner Untersuchung schon heute darlegen zu sollen, weil sie mir für die Bearbeitung der Verdauungsphysiologie des Säuglings, an der der Kinderarzt ja ein besonderes Interesse hat, von Wichtigkeit zu sein schienen.

Schlußsätze.

Die Säuregerinnung der Frauenmilch ist bei einer Anzahl von Säuren, von denen die Salz-, Milch-, Oxal- und Schwefelsäure näher untersucht wurden, absolut gebunden an eine optimale Acidität, die im allgemeinen zwischen 2 und 3 ccm $^{n}/_{10}$-Säure für

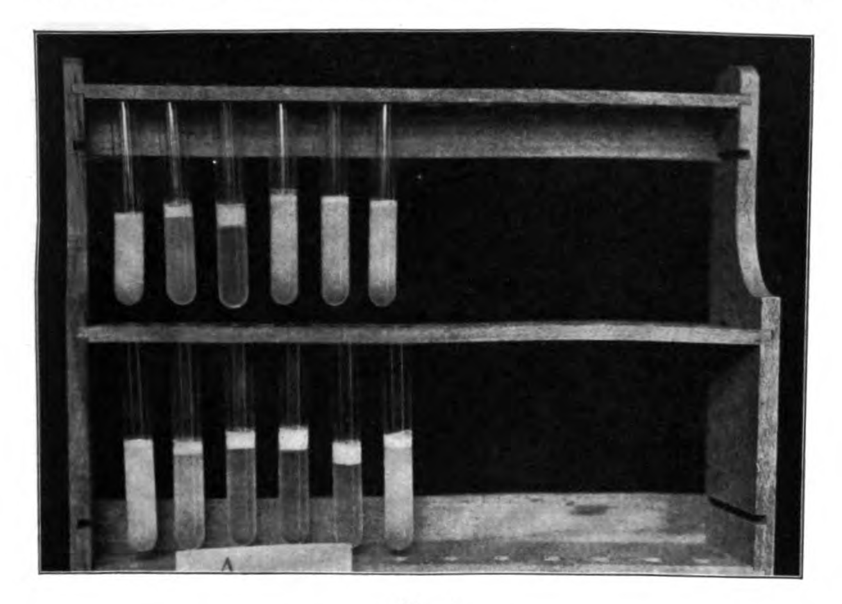


Fig. 1.

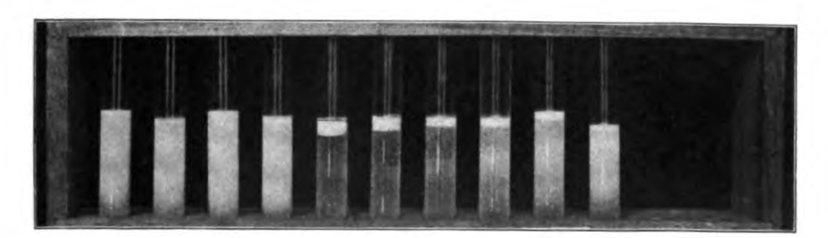


Fig. 2.

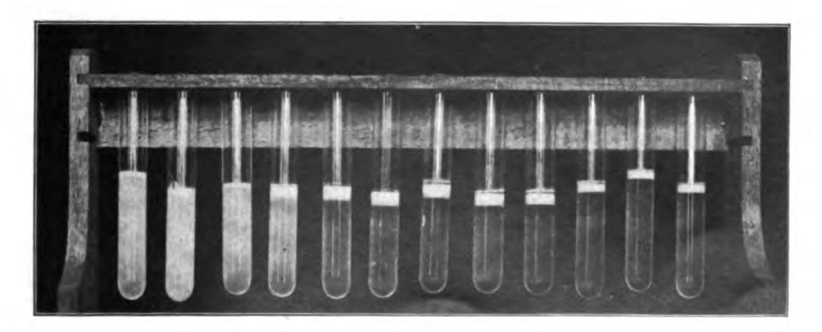


Fig. 3.

Die Photographien stellen Reihenversuche dar zur Illustration der Tabellen.

Fig. 1. oben: steigende $^{n}/_{10}$**-Salzsäure** von 0,0—0,5; unten: dieselben Säuremengen mit Hinzufügung einer Lablösung.
Fig. 2. steigende $^{n}/_{50}$**-Salzsäure** von 0,2—2,0.
Fig. 3. steigende $^{n}/_{10}$**-Essigsäure** von 0,0—1,6 und zwar in der Reihenfolge der Tabelle IV.



10 ccm Milch liegt und die in jedem einzelnen Falle durch fein abgestufte Reihenversuche ermittelt werden muß.

Die Phosphor- und Essigsäure verhalten sich insofern ganz anders, als die beste Gerinnung hier bei höheren Säurewerten, 5 bis 12 ccm $^{n}/_{10}$-Säure auf 10 ccm Milch, erzielt wird und das Säureoptimum nicht eng begrenzt ist.

Die Säurelabgerinnung ist von dem Aciditätsgrade auch insofern abhängig, als die stärkste Gerinnung ebenfalls bei demselben oder einem ähnlichen Säureoptimum eintritt wie bei der Säuerung allein. Sie unterscheidet sich von der einfachen Säuregerinnung jedoch dadurch, daß neben dem Säureoptimum, diesseits und jenseits von ihm, auch noch eine recht beträchtliche Wirkung eintritt.

Die Bedeutung des Labs beruht daher zum großen Teil darauf, daß sie den Organismus von dem scharf umgrenzten Optimum der Säurefällung emanzipiert, daß sie also eine Milchgerinnung in weit größerem Umfange garantiert, als es bei isolierter Säurewirkung der Fall sein würde.

Ein weiterer Unterschied zwischen Säure- und Säurelabwirkung ist, daß im ersten Falle Casein, im letzteren eine kalkhaltige Verbindung desselben erzeugt wird.

An Vollständigkeit der Fällung ist die optimale Säurefällung der kombinierten Fermentwirkung, welche dafür schneller eintritt, im allgemeinen überlegen.

Literaturverzeichnis.

1. Biedert, Virchows Archiv 60, 1873.
2. Bienenfeld, Diese Zeitschr. 7, 262, 1907.
3. Engel, Arch. f. Kinderheilk. 1908. (Im Druck.)
4. Fuld u. Wohlgemut, Diese Zeitschr. 5, 118, 1907; 8, 376, 1908.
5. Grützner, Pflügers Archiv 106, 463, 1905.
6. Kreidl u. Neumann, Centralbl. f. Physiol. 22, 133, 1908.

6a. „ „ „ Pflügers Archiv 123, 523, 1908.

6b. „ „ „ Sitzungsber. d. kais. Akad. d. Wissensch. in Wien. Mathem.-naturw. Klasse 117, Abt. 3, März 1908.

7. Meyer, Verhandl. d. Ges. f. Kinderheilk. Stuttgart 1906.
8. Pfeiffer, Berl. klin. Wochenschr. 1882, Nr. 44.
9. Tobler, Verhandl. d. Ges. f. Kinderheilk. Stuttgart 1906.

Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß des Broms auf die Magensaftsekretion.

Von

Dr. Togami (Japan).

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des Kgl. Pathologischen Instituts Berlin.)

(Eingegangen am 3. August 1908.)

Durch die in dieser Zeitschrift erschienenen Arbeiten von Feigl[1]) über die Wirkung der Metalle und Kolloide wie über diejenige des Jods und seiner verschiedenen Verbindungen auf die Drüsentätigkeit der Magenschleimhaut hat der Pawlowsche Magenblindsackversuch eine neue Bedeutung erhalten; denn es wurde durch diese Arbeiten der Nachweis erbracht, daß bestimmte Beziehungen zwischen dem physikalischen Charakter (Metall — Metallkolloid) einer Substanz und ihrer Wirkung auf die Magendrüsen wie zwischen chemischer Konstitution und eben dieser Wirkung bestehen. Speziell die Feiglsche Arbeit über den Einfluß des Jods und seiner Verbindungen auf die Magensaftsekretion veranlaßte mich, einen anderen Körper aus der Gruppe der Halogene in dieser Hinsicht zu untersuchen.

Feigl hat gefunden, daß das Jod die Magensaftsekretion kräftig anregt, so fand er z. B., daß ein Hund auf 200,0 ccm Wasser 4,8 ccm Saft abschied, während auf 200,0 ccm Wasser, in denen ca. 0,05 g elementares Jod gelöst waren, 22,5 ccm Saft abgesondert wurden. Bei zwei anderen Versuchen betrug die Wassersekretion 1,9 ccm gegen 8,9 ccm Saft auf die Jodgabe hin und 4,3 ccm gegen 29,0 ccm.

Feigl fand ferner, daß verschiedene Jodverbindungen um so

[1]) Diese Zeitschr. **6**, 17 u. 47, 1907, sowie **8**, 145 u. 467, 1908.

stärker die Magensaftsekretion anregen, in je labilerer Bindung sich das Jod in dem Moleküle befindet. Jedenfalls geht aus alledem hervor, daß Jod einen starken Erreger für die Magendrüsen darstellt.

Es war nun von Interesse, andere Halogene in dieser Weise zu prüfen. Fluor und Chlor verboten sich wegen der Giftigkeit zu dieser Untersuchung. Im allgemeinen ist es bekannt, daß Chloride — wenigstens so weit Untersuchungen darüber vorliegen — und vor allen Dingen das Kochsalz in allen seinen Konzentrationen, mit Ausnahme der physiologischen Kochsalzlösung, die Magendrüsen zur Sekretion anregen. Ob jedoch diese Wirkung auch dem reinen Chlor zukommt, wissen wir nicht.

Hinsichtlich der therapeutischen Verwendung stellen Jod und Brom ja im gewissen Sinne Antagonisten dar. Das Jod und seine Verbindungen werden gegeben, wenn man die Reizung irgendeines Gewebes erzeugen will. Die Salze des Broms verwendet man im Gegenteil, wenn es auf eine Herabstimmung der Funktion ankommt. Damit werden dem Brom reizende Eigenschaften keineswegs abgesprochen.

Es ist bekannt, daß bei der Jod- wie bei der Bromvergiftung Magendarmstörungen auftreten, daß eine Einatmung von Bromdämpfen stark irritierend wirkt, und daß Jod, Brom und Chlor energische Desinfizienzien darstellen. Es war nur die Frage, welche Eigenschaft des Broms bei dessen intragastraler Einverleibung auf die Magendrüsen sich geltend macht, ob das Brom etwa wie das Jod die Magendrüse reizt, oder ob es sie auf dem Wege über die Reizung lähmt, oder endlich sie ähnlich wie die Gehirnzellen einschläfert.

Ich habe die folgenden Versuche an vier Pawlowschen Kleinmagenhunden angestellt. Vor dem Versuche habe ich jedesmal diese Hunde völlig nüchtern gemacht. Zuerst habe ich eine gewisse Menge Leitungswasser durch die Magensonde eingegossen und nach der Wassersekretion dieselbe Menge der Versuchsflüssigkeit gegeben und alle 30 Minuten den Magensaft an der Magenfistel abgenommen. Die Zahlen für die Mengen geben Kubikzentimeter an.

Versuch 1.

Hund, Kuma.

Um 10,45, 100,0 Leitungswasser eingegossen.

Zeit der Abnahme	Menge der Magensekretion
11,15	6,0
11,45	5,0
12,15	4,0
12,45	5,0
1,15	5,0
1,45	2,0
	27,0

Um 1,45, 100,0 (0,05 %) wässerige Bromlösung.

Zeit der Abnahme	Menge der Magensekretion
2,15	4,6
2,45	4,55
3,15	2,5
3,45	3,3
4,15	4,9
4,45	1,0
	20,85

Versuch 2.

Hund, Leo.

Um 10,45, 100,0 Leitungswasser.

Zeit der Abnahme	Menge der Magensekretion
11,15	0,0
11,45	1,8
12,15	0,9
12,45	1,8
	4,5

Um 1,00, 100,0 (0,05 %) wässerige Bromlösung.

1,30	1,2
2,00	0,0
2,30	0,0
3,00	0,0
3,30	0,0
4,00	0,0
	1,2

Versuch 3.

Hund, Kuma.

Um 9,35, 100,0 Leitungswasser.

Zeit der Abnahme	Menge der Magensekretion
10,5	0,0
10,35	4,0
11,5	1,0
11,35	3,0
12,5	0,7
12,35	0,5
	9,2

Um 2,20, 100,0 (1 %) wässerige Bromlösung.

2,50	5,0
3,20	0,0
3,50	0,0
	5,0

Versuch 4.

Hund, Leo.

Um 9,35, 100,0 Leitungswasser.

Zeit der Abnahme	Menge der Magensekretion
10,5	1,0
10,35	0,0
11,5	1,4
11,35	1,0
12,5	0,0
12,35	0,5
	3,9

Um 2,20, 100,0 (1 %) wässerige Bromlösung.

2,50	1,0
3,20	0,0
3,50	0,0
	1,0

Versuch 5.

Hund, Kuma.

um 9,40, 100,0 Leitungswasser.

Zeit der Abnahme	Menge der Magensekretion
10,10	6,6
10,40	4,8
11,10	5,5
11,40	3,0
12,10	4,0
12,40	0,0
	23,9

Um 1,40, 100,0 (0,5 %) wässerige Bromlösung

2,10	3,0
2,40	1,0
3,10	1,0
3,40	0,4
4,10	0,1
	5,5

Versuch 6.

Hund, Kame.

Um 10,06, 100,0 Leitungswasser.

Zeit der Abnahme	Menge der Magensekretion
10,36	2,5
11,06	0,5
11,36	0,0
	3,0

Um 12,00, 100,0 (0,05 %) wässerige Bromlösung.

12,30	1,7
1,00	0,2
1,30	0,0
	1,9

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß das elementare Brom die Magendrüsen lähmt, und zwar scheint es, daß die Lähmung sofort ohne eine vorangehende Reizung eintritt.

Nach anderen Versuchsreihen hat das Bromnatrium den gleichen Effekt, nur bei einem Versuch war die Sekretion auf Bromnatrium etwa der Wassersekretion gleich.

Versuch 7.

Hund, Kuma.

Um 10,30, 100,0 Leitungswasser.

Zeit der Abnahme	Menge der Magensekretion
11,00	5.0
11,30	2.0
12,00	1,4
12,30	0.2
	8,6

Um 12,55, 100,0 (2 %) wässerige Bromnatriumlösung

1,55	2,5
2,25	0,0
2,55	0,0
	2,5

Versuch 8.

Hund, Box.

Um 10,30, 100,0 Leitungswasser.

Zeit der Abnahme	Menge der Magensekretion
11,00	2,0
11,30	0,8
12,00	0,1
12.30	0,1
	3,0

Um 12,55, 100,0 (2 %) wässerige Bromnatriumlösung.

1,55	2,4
2,25	0,8
2,55	0,2
	3,4

Versuch 9.

Hund, Kuma.

um 9,30, 100,0 Leitungswasser.

Zeit der Abnahme	Menge der Magensaftsekretion
10,30	5,5
11,00	1,5
11,30	0,0
12,00	1,0
	8,0

Um 12,30, 100,0 (0,64 %) wässerige Bromnatriumlösung.

1,00	4,7
1,30	0,7
2,00	0,0
2,30	0,0
	4,8

Versuch 10.

Hund, Box.

Um 10,00, 100,0 Leitungswasser.

Zeit der Abnahme	Menge der Magensekretion
10,30	4,0
11,00	1,0
11,30	1,0
12,00	1,8
	7,8

Um 12,30, 100,0 (0,64 %) wässerige Bromnatriumlösung.

1,00	3,0
1,30	1,0
2,00	0,1
2,30	0,1
	4,1

Ich habe ferner einige organische Brompräparate untersucht.

Versuch 11.

Hund, Kame.

Um 10,06, 100,0 Leitungswasser.

Zeit der Abnahme	Menge der Magensekretion
10,06	2,5
10,36	0,5
11,06	0,0
11,27	0,0
	3,0

Um 11,27, 100,0 Wasser + 1 Stück Bromglidintablette (= 0,05 g Brom).

Zeit der Abnahme	Menge der Magensekretion
11,57	0,4
12,27	0,6
12,57	0,1
	1,1

Versuch 12.

Hund, Box (nicht ganz nüchtern).

Um 9,50, 100,0 Wasser gegeben.

Zeit der Abnahme	Menge der Magensekretion
10,20	6,6
10,50	3,0
11,20	2,8
11,50	2,8
12,20	3,5 (nach 2 St. 30 m, 18,7)
12,50	4,0
1,20	4,0
1,50	2,5
	29,2

Um 2,00, 100,0 Wasser + 1 Stück Bromglidintablette.

Zeit der Abnahme	Menge der Magensekretion
2,30	3,0
3,00	1,8
3,30	0,8
4,00	2,5
4,30	4,5
	12,6 (nach 2 St. 30 m)

Versuch 13.

Hund, Kuma.

Um 9,00, 100,0 Wasser gegeben.

Zeit der Abnahme	Menge der Magensekretion
9,00 bis 9,30	1,0
9,30 „ 10,00	0,5
10,00 „ 10,30	0,0
	1,5

Um 10,30, 100,0 Wasser + 1 Stück Bromglydintablette gegeben.

Zeit der Abnahme	Menge der Magensekretion
10,30 bis 11,00	0,8
11,00 „ 11,30	2,0
11,30 „ 12,00	0,0
	2,8

Versuch 14.

Hund, Kame.

Um 10,06, 100,0 Wasser.

Zeit der Abnahme	Menge der Magensekretion
10,06	2,5
10,36	0,5
11,06	0,0
	3,0

Um 12,00, 100,0 Wasser + 1 Stück Bromocolltablette.

12,30	0,2
1,00	0,2
1,30	0,0
	0,4

Versuch 15.

Hund, Kame.

Um 12,00, 100,0 Wasser + 0,5 g Bromocoll gegeben.

Zeit der Abnahme	Menge der Magensekretion
12,00 bis 12,30	1,3
12,30 „ 1,00	0,3
1,00 „ 1,30	0,0
	1,6

Um 1,30, 100,0 Wasser + 0,5 g Bromglydin gegeben.

1,30 bis 2,00	1,9
2,00 „ 2,30	0,6
2,30 „ 3,00	0,0
	2,5

Aus allen meinen Versuchen — ich habe nur einen Teil der Protokolle hier mitgeteilt — ergibt sich, daß das Brom im Gegensatz zum Jod die Magendrüsen lähmt; die Lähmung tritt ein, ohne daß eine Reizung vorher nachweisbar ist. Sehr deutlich ist der sekretionslähmende Einfluß des Broms bei der reinen wässerigen Bromlösung, ferner beim Bromnatrium, während Bromeiweißpräparate, wie die Versuche mit Bromglidin lehren, in der Regel den sekretionshemmenden Einfluß zwar erkennen lassen, aber doch nicht so konstant wie die erstgenannten Substanzen.

Untersuchungen über den Blutzucker. III.

Von

B. Oppler und P. Rona.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des städt. Krankenhauses am Urban in Berlin.)

(Eingegangen am 8. August 1908.)

Das vor kurzem von P. Rona und L. Michaelis[1]) beschriebene Verfahren, Blutserum durch Behandlung mit Ferrum oxydatum dial. (Kahlbaum) von Eiweiß zu befreien, ist bisher in einer größeren Versuchsreihe am Gesamtblute selbst noch nicht geprüft worden. Die gute Verwendbarkeit dieser Methode auch für diesen Fall wird aus den in dieser Arbeit mitgeteilten Versuchen ersichtlich. Der Umstand, daß die Enteiweißung mit kolloidalem Eisenhydroxyd bei gewöhnlicher Temperatur und ohne Änderung der Reaktion vor sich geht, ist neben der leichten Ausführbarkeit ein Vorteil der Methode. Daß das Fällungsmittel zugleich mit dem gefällten Eiweiß ausgeschieden wird und somit das eiweißfreie Filtrat außer den geringen Mengen des zugesetzten Elektrolyten keinerlei fremde Zutaten enthält, erleichtert die nachträgliche Verarbeitung der Flüssigkeit bedeutend. Namentlich die Eigenschaft des kolloidalen Eisenhydroxydes, Farbstoffe des Blutes vollkommen mitzureißen, ist bei der Bestimmung des Zuckers im Blut — der, wie bereits nachgewiesen wurde, vom Eisenhydroxyd bei keiner Konzentration adsorbiert wird — von großem Vorteil, da das wasserklare Filtrat auf einen geringen Bruchteil des ursprünglichen Blutvolumens eingeengt werden kann und dennoch vollkommen klar bleibt und sich vortrefflich für das Polarisieren eignet.

---

[1]) Diese Zeitschr. 7, 329, 1908.

Natürlich kann bei der Bestimmung des Zuckers neben und nach der Polarisation eine der Reduktionsmethoden, z. B. die Bangsche, oder die Bestimmung mittels Gärung ausgeführt werden.

Bevor wir auf die Verwendung der Methode zur Untersuchung des Blutzuckers eingehen, soll die vorbereitende Enteiweißung genau geschildert werden.[1])

Zur Aufnahme des Blutes dient ein weithalsiger Kolben, dessen Wandungen mit der für die zu erwartende Blutmenge zureichenden Quantität NaFl bestrichen sind. Auf einer empfindlichen Handwage wird derselbe genau tariert. In diesem Kolben wird das Blut direkt aus dem Gefäß unter Schütteln aufgefangen, gewogen und sofort verarbeitet. Für jede Blutprobe ist schon vorher 1 Liter dest. Wasser bereitgestellt worden. Mit einem Teile desselben wird das Blut quantitativ in einen geräumigen Kolben übergeführt und dann noch bis zur zehnfachen Verdünnung Wasser zugesetzt. Der Rest des Wassers dient zur Verdünnung der Eisenlösung[2]), welche sofort in dünnem Strahl unter beständiger lebhafter Bewegung des Kolbens der Blutlösung hinzugefügt wird. Bezüglich der erforderlichen Menge Eisenlösung ist zu bemerken, daß auf je 1 g (unverdünntes) Hundeblut 3 ccm, auf je 1 g Kaninchenblut 2,5 ccm der (unverdünnten) Eisenlösung in der Regel genügen. Ein Überschuß innerhalb gewisser Grenzen ist an sich unschädlich. Die Blut-Eisenmischung bleibt nun unter häufigem Schütteln einige (ca. 10) Minuten stehen; während dieser Zeit erfolgt bereits eine reichliche flockige Ausscheidung der Eiweiß-Eisen-„Verbindung". Jetzt setzt man 1 g fein gepulvertes $MgSO_4$ auf einmal hinzu und schüttelt nun kräftig 1 bis 2 Minuten lang. Damit ist die Enteiweißung vollendet. Ist sie gut gelungen, so erfolgt die totale Ausflockung schnell, und die darüber stehende klare farblose Flüssigkeit ist zur Filtration fertig.

---

[1]) Eine kurze Beschreibung der Methode, auch für das Gesamtblut, hat bereits einer von uns (R.) in Gemeinschaft mit L. Michaelis in dieser Zeitschr. 8, 356, 1908 mitgeteilt.

[2]) Ferrum oxydat. dialysat. (Liq. ferri oxydati dialys.). Es sei ausdrücklich betont, daß der Liquor ferri oxychlorati (Pharm. Germ.), der von den Apothekern oft statt des Liq. ferri. oxyd. dial. gegeben wird, nicht angewendet werden darf.

Ein Hauptvorzug des Verfahrens ist nun, daß auch in den Fällen, in welchen die mehr oder weniger ausgesprochene Färbung des Filtrates eine unvollständige Fällung des Hämoglobins anzeigt, nachträglich zu jeder Zeit eine Korrektur stattfinden kann, durch erneute Behandlung mit sehr kleinen Mengen — einige Tropfen bis mehrere Kubikzentimeter — der Eisenlösung (diesmal auch mit Vorteil mit Wasser verdünnt). Selbst eine mehrmalige Korrektur beeinträchtigt die Genauigkeit der nachträglichen Zuckerbestimmung in keiner Weise, wenn sie auch die ganze Prozedur verlängert. Um dies zu vermeiden, nehme man die etwa nötige Korrektur gleich in der ursprünglichen Lösung vor. Bei einiger Übung gelingt jedoch die Enteiweißung ohne nachträgliche Hinzufügung von Eisenlösung in den allermeisten Fällen. Ein weiterer Elektrolytzusatz ist unnötig und auch nicht vorteilhaft, da er beim nachfolgenden starken Einengen stören könnte.

Hat man so eine völlig farblose klare Lösung erhalten, so wird durch ein Faltenfilter filtriert; der gelatinöse Rückstand und die durch Auspressen des Filters gewonnene Flüssigkeit können noch weiter auf der Zentrifuge ausgeschleudert und die so gewonnene Flüssigkeit zum Filtrat gegeben werden. Unbedingt nötig ist das Zentrifugieren nicht. Wir haben so einen aliquoten Teil der Gesamtflüssigkeit (verdünntes Blut + Eisenlösung) erhalten, der je nach der Menge des angewandten Eisens 80 bis 90% der Gesamtflüssigkeit beträgt und dessen Volumen genau bestimmt wird. Das wasserklare, eiweißfreie Filtrat wird nun mit wenigen Tropfen verdünnter Essigsäure angesäuert, dann bei vermindertem Druck (ca. 15 mm Hg) und 45° Wasserbadtemperatur auf wenige (3 bis 5) ccm eingeengt und quantitativ in einen graduierten Standzylinder von 10 ccm Inhalt übergeführt. Nachdem das Volumen der Flüssigkeit bestimmt ist, wird sie filtriert in die Polarisationsröhre übergeführt und polarimetrisch untersucht[1]). Die so gewonnene Flüssigkeit erscheint in 2 dm dicker Schicht ganz blaßgelb und ist ebensogut zu untersuchen wie eine reine wässerige Zuckerlösung. Die Biuretreaktion gab die so stark eingeengte enteiweißte Blut-

[1]) Die Beobachtung geschah in einem eigens dazu angefertigten sehr dickwandigen Polarisationsrohr von 189·4 mm Länge und nur ca. 5 ccm Inhalt.

lösung nie, ebenso war die Ferrocyankaliumprobe negativ. Nur in einigen Fällen entstand nach dieser Probe eine eben wahrnehmbare Opalescenz. In einem Falle, wo die Essigsäure-Ferrocyankaliumprobe einen spärlichen flockigen Niederschlag gab, gelang es, durch Behandlung der polarimetrisch vorher untersuchten Lösung mit Kaolin[1]) auch den Rest des Eiweißes zu entfernen. Eine Änderung des Drehungsvermögens war aber nicht eingetreten, ein Beweis, daß es sich nur um die Anwesenheit von Eiweißspuren handeln konnte.

Bezeichnen wir mit c den aliquoten eingeengten Teil, mit z den am Polarimeter abgelesenen in c vorhandenen Prozentgehalt an Zucker, ferner mit l das Volumen der Gesamtflüssigkeit (verdünntes Blut + verdünnte Eisenlösung) und mit Z den nicht eingeengten aliquoten Teil, so ist der Zuckergehalt x in Milligramm in der zur Untersuchung entnommenen Blutmenge leicht zu berechnen, nach der Formel $x = \frac{c \cdot z \cdot l}{Z \cdot 100}$.

Da nun außer z alle übrigen bekannten Faktoren in einer für das Resultat günstigen Weise sich beeinflussen lassen, so wird der größte Fehler bei einer falschen Bestimmung von z gemacht werden. Unter den von uns gewählten Bedingungen muß eine Differenz von $\pm 0{,}02^{\circ}$ als äußerste zulässige Grenze bei den Doppelanalysen gelten, welche mit dem empfindlichen Apparat von Schmidt und Haensch, mit dreiteiligem Gesichtsfeld, den wir benutzten, nur in vereinzelten Fällen erreicht wurde. Bei den meisten Ablesungen betrug der Fehler 0°, seltener $\pm 0{,}01^{\circ}$.[2])

Die Umrechnung des Befundes der Reduktionswerte auf die Gesamtmenge ist so einfach, daß ihre nähere Beschreibung überflüssig ist.

An die Bestimmung des „Blutzuckers" sind so viele den Physiologen wie den Klinikern gleich fesselnde Probleme geknüpft, daß die Anwendung der vorher beschriebenen Ent-

[1]) Vgl. diese Zeitschr. 5, 365, 1907.

[2]) Durch ungenaue Ablesung werden vollständig befriedigend die ziemlich großen Differenzen aufgeklärt, wie sie sich z. B. in V, 2a und b (siehe Tabelle) zeigen. Die große Abweichung der Werte VII, 6a und b ist vor allem durch die Größe von c = 12,65 ccm bedingt.

eiweißungsmethode zu diesem Zwecke, als Fortsetzung der zwei ersten Mitteilungen,[1]) nach verschiedenen Richtungen hin uns wünschenswert erschien. Wenn wir hier speziell den Einfluß der Blutentziehung auf die Änderung der Traubenzuckerkonzentration im Blute zum Gegenstand der Untersuchungen wählten, so war dafür maßgebend die grundlegende Bedeutung, die der genauen Kenntnis dieses Faktors für die Beurteilung aller die Blutzuckerkonzentration betreffenden Untersuchungen zukommt. Da andererseits über diesen Gegenstand mancherlei Tatsächliches bekannt ist,[2]) so war damit die wünschenswerte Kontrolle gegeben, die über den Wert eines neuen Verfahrens zur Vorbereitung für die Zuckerbestimmung zu entscheiden hat.

Für die Versuchsanordnung war bestimmend, daß wir häufige, über einen längeren Zeitraum sich erstreckende Untersuchungen am gleichen Individuum vornehmen wollten. Daraus ergab sich die Notwendigkeit, einmal die einzelnen Blutentnahmen bezüglich ihrer Menge in für das Tier unschädlichen Grenzen zu halten und die Pausen zwischen den einzelnen Aderlässen vorsichtig zu verkleinern. Nur so war es möglich, ohne Schädigung der natürlichen Bedingungen, Aufklärung darüber zu schaffen, ob die zeitliche Folge der Aderlässe — bei welchen wir zunächst hauptsächlich die Wirkung nicht schnell aufeinanderfolgende Blutentnahmen im Auge hatten — den Blutzuckergehalt zu ändern vermag. Auf diese Weise konnten wir auch über die Frage der Konstanz oder Nicht-Konstanz des Blutzuckers bei den betreffenden Tieren Erfahrungen sammeln.

Zur Bestimmung des Traubenzuckers im Blut bedienten wir uns der polarimetrischen Methode. Die absoluten Werte gibt, wie bekannt, diese Methode zu niedrig an,[3]) wovon wir uns auch in allen Fällen, in welchen wir parallele Bestimmungen

---

[1]) l. c.

[2]) Vgl. Fr. Schenck, Über den Zuckergehalt des Blutes nach Blutentziehung. Pflügers Archiv 57, 553, 1894. — Kurz vor Abschluß des experimentellen Teiles dieser Arbeit erschien die interessante Mitteilung von Nils Andersson. Über das Verhalten des Blutzuckers beim Aderlaß. Diese Zeitschr. 12, 1, 1908.

[3]) Vgl. hierzu namentlich die Arbeiten von Lepine und Boulud. Compt. rend. **133**, 138; **134**, 398; **135**, 139; **138**, 610; **143**, 500, 539.

mit der Bangschen Methode ausgeführt haben (wovon einige in den Tabellen aufgenommen sind), überzeugen konnten.[1]) Was wir polarimetrisch gemessen haben und zunächst messen wollten, ist demnach nicht die Konzentration des Traubenzuckers im Blute, sondern bestenfalls die Änderung seiner Konzentration. Die Voraussetzung für die Richtigkeit dieser Annahme bildet, daß die anders drehenden Substanzen durch die Blutentnahme keine die Drehung wesentlich beeinflussende Änderung erfahren. Wie die unten mitgeteilten Versuche an Hunden zeigen, erscheint diese Voraussetzung berechtigt.

Die Versuche wurden an Kaninchen und an Hunden angestellt. Um ihren natürlichen Lebensbedingungen möglichst gerecht zu werden, wurden die Hunde in einer geräumigen Hürde in größerer Gemeinschaft gehalten. Die Nahrung bestand aus Fleisch und wurde zwei Stunden nach der um 10 Uhr vormittags erfolgenden Blutentnahme verabreicht. Die Kaninchen lebten in geräumigen Ställen und erhielten zum Futter Hafer und Rüben. Hervorgehoben sei noch, daß zwei der Hunde (Vers. V und VII) während der Versuche trächtig waren und warfen. Der Hund des Versuches VII säugte drei Junge. Das Kaninchen des Versuches I starb vorzeitig am 12. VI. vermutlich an einer von der Ohrvene ausgehenden Infektion. — Die Aderlässe erfolgten bei den Kaninchen stets durch Eröffnung der Randvene des Ohres; die Dauer dieser Prozedur war bei den verschiedenen Tieren verschieden, schwankend zwischen 2 und 5 Minuten. Den Hunden wurde das Blut aus der Vena jugularis mit der Hohlnadel entnommen, nachdem ein die Haut und Fascie durchtrennender Querschnitt das Gefäß freigelegt hatte. Der Schnitt wurde nachher durch Naht geschlossen. Die Blutentnahme erfolgte stets ganz glatt; die Tiere verhielten sich dabei ruhig. Niemals fand eine Fesselung der Kaninchen oder Hunde zum Zwecke des Aderlasses statt.

Über die Ergebnisse der Versuche geben die Tabellen Aufschluß. Sie zeigen, daß die Menge des entzogenen Blutes zwar wechselt und die Aderlässe kräftige waren, daß aber exzessive Blutverluste vermieden wurden, die das physiologische Bild

---

[1]) Das Verhältnis der Polarisations- und der Reduktionswerte wird in einer folgenden Mitteilung ausführlich erörtert werden.

hätten trüben können. Die Pausen zwischen den einzelnen Blutentnahmen schwankten zwischen $5^1/_2$ Wochen und 10 Minuten beim Hunde; beim Kaninchen betrugen die kürzesten Pausen 3 Tage. Ursprünglich lag im Plane unserer Untersuchung, auch beim Kaninchen den Einfluß schnell folgender Aderlässe nach Schencks Vorgang zu prüfen. Die Arbeit von Nils Andersson[1]), die uns am 29. VII. bekannt wurde, machte diese Untersuchung unnötig.

Die Versuche bestätigen im wesentlichen die Erfahrungen früherer Forscher. Es zeigt sich, daß der Zuckergehalt des Kaninchenblutes auch bei zeitlich lange getrennten Aderlässen Schwankungen unterworfen ist, die mit dem operativen Eingriff als solchem nicht in Zusammenhang gebracht werden können. Diese Schwankungen sind ganz unregelmäßig in bezug auf Zeit und Größe. Die Bedingungen, die dieses Verhalten beherrschen, können wir nicht klar übersehen. Bei kürzeren Serien der Versuche (wie im Versuch I) kann es auch der Fall sein, daß die Schwankungen nicht so deutlich zutage treten.

Ein anderes Bild zeigen dagegen die Versuche an Hunden. Hier ist die Konstanz der gefundenen Drehungswerte bemerkenswert. Im allgemeinen zeigen die Bestimmungen untereinander so geringe Abweichungen, daß sie fast noch im Bereiche der durch die Methodik bedingten Fehler liegen. Nur einmal im Versuch VI, 1 und 2 ist eine Schwankung von 21 % zu verzeichnen. Ein weiterer Unterschied gegenüber dem Kaninchen besteht darin, daß die beim Hunde eintretenden Änderungen, wenn sie einmal eingetreten sind, nur langsam einer neuen Änderung weichen. Auch wenn wir berücksichtigen, daß der Blutverlust, bezogen auf das Körpergewicht, im ganzen beim Kaninchen etwas größer war als wenigstens bei einigen der Hunde, so können wir auch diesem Umstande keine maßgebende Rolle zuerkennen, da auch in dieser Richtung jede Gesetzmäßigkeit zu fehlen scheint. Wir sehen ferner, daß beim Hunde Schwangerschaft, Geburt und Lactation ohne deutlichen Einfluß auf den Drehungswert bleiben. — Ob und wie weit die Umgebungstemperatur von Einfluß auf den Zucker-

[1]) l. c.

gehalt ist, worauf Embden und Lüthje[1]) die Aufmerksamkeit gelenkt haben, läßt sich aus unseren Versuchen bisher nicht beurteilen. Die Beobachtungen an Kaninchen müssen dabei völlig außer Betracht bleiben.

Im ganzen bestätigen demnach die Versuche, deren Wert uns in ihrer Dauer zu liegen scheint, die herrschende Auffassung, daß die Traubenzuckerkonzentration im Blute des Hundes, soweit dies aus der gleichbleibenden Drehung zu schließen ist, einen annähernd konstanten, individuell in engen Grenzen verschiedenen Wert darstellt. Die Konstanz der Drehung anders als durch Konstanz der Traubenzuckerkonzentration (wie auch aller anderen drehenden Körper im Blute) erklären zu wollen, wäre jedenfalls gekünstelt, da bei einer eventuellen Verschiebung der gegenseitigen Mengenverhältnisse dieser Substanzen eine trotzdem gleichbleibende Drehung höchst unwahrscheinlich wäre. Aderlässe unter den in unseren Versuchen eingestellten Bedingungen bringen eine deutliche auf sie zu beziehende Änderung in dieser Richtung nicht hervor. Über die Verhältnisse bei (wiederholten) Blutentziehungen in Intervallen zwischen 30 Minuten und 24 Stunden sagen unsere Versuche natürlich nichts aus.

Versuch I.

Kaninchen, männlich.

Nr.	Datum	Luft-Temp.	Blut g	Aliquoter Teil		Blut-Zucker		Bemerkungen
				eingeengt ccm	Zucker %	mg	%	
1	19. V. 08	15°	28,80	9,70	0,18	19,56	0,094[3])	Gewicht 3650 g
2	26. V. 08	36°[2])	24,00	8,90	0,27	28,59	0,119[4])	„ 3470 g 12. VI. †

[1]) G. Embden, H. Lüthje, E. Liefmann, Über den Einfluß der Außentemperatur auf den Blutzuckergehalt. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 10, 265, 1907.

[2]) Das Tier befand sich in einer Couveuse.

[3]) Nach Bang 0,125 %.

[4]) Nach Bang 0,167 %.

Versuch II.

Kaninchen, männlich.

Nr.	Datum	Luft-Temp.	Blut g	Aliquoter Teil eingeengt ccm	Aliquoter Teil Zucker %	Blut-Zucker mg	Blut-Zucker %	Bemerkungen
1	19./V. 08	15°	22,30	7,90	0,24	22,23	0,100[1])	Gewicht 3910 g
2	26./V. 08	17°	28,70	8,20	0,25	25,15	0,088[2])	
3	4./VI. 08	27°	30,70	9,30	0,21	23,68	0,077	„ 4000 g
4	15./VI. 08	21°	23,00	7,40	0,33	27,18	0,118	„ 3850 g
5	29./VI. 08	19°	25,5	7,80	0,23	20,36	0,080	„ 3890 g
6	14./VII. 08	24°	26,13	9,70	0.19	20,58	0,079	„ 4100 g
7	30./VII. 08	25°	19,10	8,90	0,25	24,32	0,127	„ 3890 g

Versuch III.

Kaninchen, männlich.

Nr.	Datum	Luft-Temp.	Blut g	Aliquoter Teil eingeengt ccm	Aliquoter Teil Zucker %	Blut-Zucker mg	Blut-Zucker %	Bemerkungen
1	21./V. 08	16°	22,40	9,00	0,26	26,69	0,116[3])	Gewicht 2750 g
2	29./V. 08	9°[4])	32,20	9,20	0,26	27,59	0,086	„ 2730 g
3	4./VI. 08	27°	26,10	9,15	0,25	26,88	0,100	
4	17./VI. 08	29°	22,20	8,10	0,15	13,50	0,061	
5	2./VII. 08	27°	25,60	9,60	0,25	26,94	0,105	Gewicht 2750 g
6	10./VII. 08	17,5°	30,10	8,80	0,32	32,75	0,188	„ 2980 g

Versuch IV.

Kaninchen.

Nr.	Datum	Luft-Temp.	Blut g	Aliquoter Teil eingeengt ccm	Aliquoter Teil Zucker %	Blut-Zucker mg	Blut-Zucker %	Bemerkungen
1	30./VI. 08	20°	27,60	8,90	0,24	25,60	0,093	Gewicht 2370 g
2	2./VII. 08	26,5°	26,55	8,60	0,28	27,76	0,104	„ 2150 g
3	10./VII. 08	18°	27,70	10,20	0,21	24,50	0,088	„ 2395 g

[1]) Nach Bang 0,108 %.
[2]) Nach Bang 0,109 %.
[3]) Nach Bang 0,132 %.
[4]) Das Tier befand sich in einem Kühlraum.

Versuch V.

Hund, weiblich.

Nr.	Datum	Luft-Temp.	Blut g	Aliquoter Teil eingeengt ccm	Aliquoter Teil Zucker %	Blut-Zucker mg	Blut-Zucker %		Bemerkungen
1	25./V. 08	15°	33,70	8,40	0,27	28,78	0,085		Gewicht 18000 g
2a	2./VI. 08	29°	27,60	9,60	0,23	26,55	0,096	0,096	Am 27./V. Junge geworfen, säugt nicht.
2b			34,50	10,20	0,26	33,27	0,096		
3a	18./VI. 08	24°	28,20	8,00	0,25	23,80	0,085	0,094	
3b			29,35	7,70	0,32	29,80	0,102		
4a	27./VII. 08	22°	26,93	9,80	0,22	24,45	0,091	0,092	
4b			27,85	9,85	0,23	25,77	0,093		
4c	1/2 Stunde		27,45	9,20	0,26	27,02	0,098	0,096	
4d	nach a u. b		28,90	10,20	0,24	27,32	0,093		

Versuch VI.

Hund, männlich.

Nr.	Datum	Temp.	Blut g	Aliquoter Teil eingeengt ccm	Aliquoter Teil Zucker %	Blut-Zucker mg	Blut-Zucker %		Bemerkungen
1	10./VI. 08	13,5°	41,00	9,80	0,29	39,32	0,096		Gewicht 8110 g
2a	25./VI. 08	25°	25,80	10,20	0,14	16,98	0,066 [1]	0,074	„ 8600 g
2b			35,35	9,90	0,24	29,06	0,082 [2]		
3a	6./VII. 08	17°	29,90	7,60	0,25	22,11	0,074	0,075	„ 8600 g
3b			30,55	10,10	0,20	23,23	0,076		
4a	23./VII. 08	22°	31,60	10,20	0,21	26,78	0,085	0,085	„ 8210 g
4b			31,80	8,20	0,27	26,84	0,084		
5a	24./VII. 08	21°	30,15	9,65	0,24	26,57	0,088	0,085	„ 8120 g
5b			32,00	9,00	0,25	25,93	0,081		

[1]) Nach Bang 0,101%.

[2]) Nach Bang 0,109%.

Versuch VII.

Hund, weiblich.

Nr.	Datum	Temp.	Blut g	Aliquoter Teil eingeengt ccm	Aliquoter Teil Zucker %	Blut-Zucker mg	Blut-Zucker %		Bemerkungen
1a	12./VI. 08	18°	28,20	9,80	0,23	26,69	0,095	0,094	Gewicht 12650 g,
1b			35,00	9,90	0,26	32,47	0,093		trächtig
2a	27./VI. 08	18°	40,80	—	—	—	—		
2b			37,80	—	—	—	—		
3a	9./VII. 08	17°	28,80	8,80	0,24	25,47	0,086	0,092	In der Nacht vom
3b			31,60	8,50	0,30	30,69	0,097		8.—9./VII. 4 Junge geworfen, Gewicht 11470 g
4	14./VII. 08	24°	28,28	9,10	0,25	26,04	0,092		Blut stark fetthaltig, säugt 3 Junge, Gewicht 10300 g
5a	20./VII. 08	25°	31,90	—	—	—	—	0,083	Blut stark fetthaltig,
5b			30,20	9,70	0,22	24,93	0,083		säugt 3 Junge, Gewicht 10 550 g
6a	21./VII. 08	19°	27,20	9,40	0,20	21,46	0,079	0,087	Blut stark fetthaltig.
6b			28,90	12,65	0,19	27,42	0,095		säugt 3 Junge, Gewicht 10250 g,

Versuch VIII.

Hund, weiblich.

Nr.	Datum	Temp.	Blut g	Aliquoter Teil eingeengt ccm	Aliquoter Teil Zucker %	Blut-Zucker mg	Blut-Zucker %		Bemerkungen
1a	3./VII. 08	22°	26,15	8,50	0,22	20,56	0,079	0,076	Gewicht 9590 — Blut aus beiden Jugularvenen
1b	10 Minuten nach a		29,40	9,40	0,20	21,13	0,072		Intervall a u. b ca. 10 Minuten
2a	8./VII. 08	22°	27,00	8,10	0,22	19,31	0,072 [1]	0,074	„ 9140
2b			20,60	9,50	0,15	15,76	0,076 [2]		
3a	13./VII. 08	29°	26,70	8,80	0,21	20,40	0,076	0,077	„ 9540
3b			26,40	8,30	0,22	20.55	0,078		
4a	16./VII. 08	21°	35,50	9,00	0,25	26,15	0,074	0,073	„ 9320
4b			34,95	8,50	0,25	24,93	0,071		
5a	17./VII. 08	24°	31,15	10,00	0,22	25,17	0,081	0,080	„ 9350
5b			35,55	9,80	0,25	28,11	0,079		
6a	31./VII. 08	23°	24,40	8,80	0,18	18,05	0,078	0,078	„ 8700
6b			26,75	9,60	0,19	21,19	0,078		
6c	½ Stunde später als a u. b		27,65	9,00	0,20	20,88	0,076	0,077	
6d			27,47	8,96	0,21	21,19	0,078		

[1]) Nach Bang 0,096%.
[2]) Nach Bang 0,100%.

Beitrag zum Wesen der Antikomplementwirkung.

Von

v. Dungern und Coca.

(Aus dem Institut für experimentelle Krebsforschung in Heidelberg.)

(Eingegangen am 8. August 1908.)

Bekanntlich entsteht eine Antikomplementwirkung, wenn gelöste Antigene mit entsprechenden Immunkörpern zusammentreffen. Zur Erklärung hat man angenommen, daß das Komplement durch das System Immunkörper-Antigen gebunden wird.

Diese Anschauung läßt sich jedoch nicht durch Bindungsversuche sicherstellen; sie beruht nur auf einem Analogieschlusse. Wir möchten daher über eine Beobachtung berichten, die uns geeignet erscheint, diese Auffassung vom Wesen der Antikomplementwirkung zu stützen.

Wir untersuchten die Wirkung eines durch Vorbehandlung eines Kaninchens mit Hühnerserum gewonnenen Immunserums gegen verschiedene Dosen von Kaninchenkomplement. Es zeigte sich bei der Vereinigung mit Hühnerserum eine starke Antikomplementwirkung. Diese verschwand aber auffallenderweise vollkommen, wenn genügend lange gewartet wurde.

Versuch.

Das Immunserum, welches $^1/_2$ Stunde auf 60° erwärmt worden war, präcipitiert Hühnerserum $^1/_{80}$ ccm in der Dose von $^1/_{160}$ ccm. Es wird immer in der Menge von $^2/_{10}$ ccm verwandt. Das Hühnerserum wird immer in der Menge von $^1/_{80}$ ccm benutzt. Das Kaninchenkomplementserum wird abgestuft und in der Menge von $^4/_{10}$ ccm bis $^1/_{160}$ ccm zugesetzt.

Das Kaninchenserum wird zusammengebracht mit Hühnerserum oder mit Immunserum oder mit beiden, und entweder $^3/_4$ Stunden oder $5^1/_2$ Stunden zusammen gelassen. Dann erfolgt Zusatz von Rinderblut, das mit Immunkörper beladen

ist. Zur weiteren Kontrolle wird noch das Komplementserum allein geprüft.

Totale Lösung tritt in der Kontrolle ein bei $^4/_{10}$ ccm nach 12 Minuten, $^2/_{10}$ nach 27 Minuten, $^1/_{10}$ nach $4^1/_2$ Stunden.

Das Hühnerserum für sich allein bewirkt nur eine geringe Hemmung. Wenn es $^3/_4$ Stunden eingewirkt hat, so tritt totale Lösung ein bei $^4/_{10}$ Komplementserum wie in der Kontrolle, bei $^2/_{10}$ wie in der Kontrolle, bei $^1/_{10}$ etwas langsamer, nach $4^1/_2$ Stunden noch nicht. Wenn es $5^1/_2$ Stunden eingewirkt hat, tritt die Lösung ein bei $^4/_{10}$ Komplementserum wie in der Kontrolle nach 12 Minuten, bei $^2/_{10}$ nach 29 Minuten, bei $^1/_{10}$ nach $4^1/_2$ Stunden noch nicht.

Immunserum allein hemmt noch etwas stärker. Nach $^3/_4$ stündiger Einwirkung hämolysiert $^4/_{10}$ ccm Komplementserum nach 14 Minuten, $^2/_{10}$ nach $3^1/_2$ Stunden, $^1/_{10}$ löst nach $4^1/_2$ Stunden noch nicht. Nach $5^1/_2$stündiger Einwirkung hämolysiert $^4/_{10}$ ccm nach 26 Minuten, $^2/_{10}$ nach $3^1/_2$ Stunden, $^1/_{10}$ löst nach $4^1/_2$ Stunden noch nicht.

Viel stärker aber ist die Wirkung bei der Vereinigung von Antigen und Antikörper. Nach $^3/_4$stündiger Einwirkung tritt die Blutlösung erst ein durch $^4/_{10}$ ccm Komplementserum nach 2 Stunden, durch $^2/_{10}$ nach 10 Stunden; nach $5^1/_2$stündiger Einwirkung durch $^4/_{10}$ ccm erst nach 10 Stunden, durch $^2/_{10}$ nach 16 Stunden.

Nach 24 Stunden sind alle Reihen gleich. $^1/_{10}$ ccm hat überall total gelöst, $^1/_{20}$ dagegen nicht total.

Wir erkennen also, daß bei der Antikomplementwirkung des benutzten Systems keineswegs eine Zerstörung des Komplementes stattfindet. Auch eine Modifikation des Komplementes ist nicht anzunehmen. Wir sehen ja, daß auch die kleinste Komplementmenge, die überhaupt ausreicht, um das mit Immunkörper beladene Blut aufzulösen, durch die Antikomplementwirkung nicht dauernd gehemmt wird.

Es kann nur eine Aufnahme des Komplementes von seiten des in der Flüssigkeit mit Immunkörper vereinigten Antigens vorliegen, die in diesem Falle keine feste ist.

Ob es sich dabei um eine chemische Bindung handelt, die reversibel ist, oder nur um eine Lösung, mag dahingestellt bleiben.

Ein Heißätherextraktionsapparat.

Von

Wilhelm Kulka,

k. u. k. Regimentsarzt derzeit in Teschen (Schlesien).

(Aus dem Laboratorium für med. Chemie der k. u. k. Universität in Wien.)

(Eingegangen am 9. August 1908.)

Mit 1 Figur im Text.

Anläßlich einer eingehenderen Beschäftigung mit chemischen Untersuchungen der Gehirnsubstanz sah ich mich, da der von Thudichum konstruierte Apparat[1]) mir wegen seiner Unzulänglichkeit und wohl auch wegen des hohen Kostenpunktes (Platinblase) nicht zusagte, genötigt, zur Darstellung und Scheidung der verschiedenen Produkte in Anlehnung an die Untersuchungen Thudichums einen Apparat zu konstruieren, mit dessen Hilfe auf leichte und bequeme Art eine sich selbst regulierende Extraktion mit heißem Äther ermöglicht werden sollte. Es gelang, dieses Problem in sehr einfacher und, was nicht unwesentlich ist, auch wenig kostspieliger Weise zu lösen. Trotzdem wäre von einer Publikation desselben vor Abschluß der Arbeit abgesehen worden, wenn nicht die in der letzten Zeit erschienenen Arbeiten und Kontroversen über Lipoide und lipoidähnliche Substanzen der verschiedensten Herkunft mich dazu veranlassen würden.

Da meine Arbeiten durch eine Reihe unvorhergesehener äußerer Gründe eine Unterbrechung auf längere Zeit erlitten, wollte ich wenigstens den Apparat, von dessen richtiger Anwendung bei den Untersuchungen in der obengenannten Frage mancher Nutzen zu erwarten sein dürfte, zur allgemeineren Kenntnis bringen, zumal die im Apparat stattfindende Er-

---

[1]) Beschrieben in Thudichum, Die chem. Konstitution des Gehirns der Menschen und Tiere. Tübingen 1901.

wärmung bei Äther höchstens 32 bis 33° beträgt, bei welcher Temperatur die in Frage kommenden Materien, soweit bekannt, noch keine Zersetzung erleiden.

Bemerken will ich noch, daß es mir schon bei der Darstellung von Lecithin aus Hühnereiweiß nach der Methode von Bergell[1]) aufgefallen war, daß nach der Behandlung des Kadmiumchloridniederschlages statt mit kaltem Äther, mit warmen Äther in dem hier beschriebenen Apparate ein wachsartiges, fast rein weißes, geruchloses, konstantes Präparat erhalten wurde, das auch, nachdem es mehrere Monate während der warmen Jahreszeit in einem nicht gerade Hervorragendes leistenden Eiskasten aufbewahrt worden war, kaum nennenswerte Veränderungen bot.

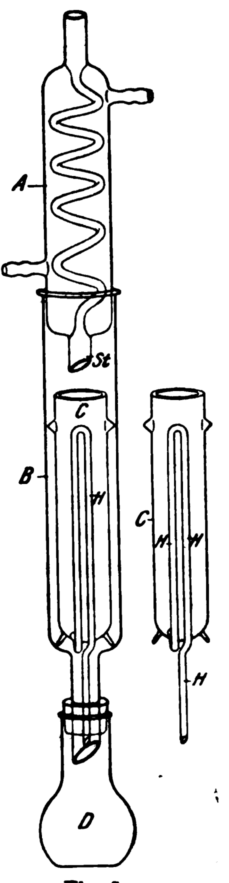


Fig. 1.

Ob das nun mit der vollständigeren Entfernung der von Ulpiani[2]) und Bergell[3]) beschriebenen Oleyllecithine zusammenhing, habe ich damals nicht untersucht.

Beschreibung des Apparates.[4]) Derselbe stellt auf den ersten Anblick gleichsam eine Modifikation (allerdings eine sehr wesentliche) des allbekannten Soxhletschen Extraktionsapparates dar. Er besteht aus drei Teilen, zu denen als vierter der Kolben kommt: 1. dem zum Mantelrohr genau angeschliffen passenden Schlangenkühler (*A* der nebenstehenden Figur), 2. dem unten in eine engere Röhre übergehenden Mantelrohr (*B*), das entweder am unteren Ende mit einem genau passenden Anschliff an das Kölbchen (*D*) [4.] versehen ist (zum Apparat werden in der Regel zwei geliefert) oder ohne das

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 33, 2584, 1900.

[2]) Gaz. chim. ital. 31, II, 47 ref. im Chem. Centralbl. 1901, II, 30 u. 193.

[3]) l. c.

[4]) Derselbe wird in der hier angegebenen Form von der Firma Paul Haak, Glasbläserei in Wien IX, Garelligasse, ausgeführt.

letztere verfertigt wird, wobei dann die Verbindung an ein weithalsiges Kölbchen durch einen gut passenden, vorher gut mit Äther usw. gereinigten Korkstopfen hergestellt werden kann, 3. kommt hierzu der Einsatz (*C*) mit Heberohr (*H*).

Ad 1. Um Verdampfungsverluste und auch Feuergefährlichkeit zu vermeiden, dient ein 21 cm langer, $5^1/_2$ cm breiter Schlangenkühler mit etwa sieben Windungen von entsprechend weiter Lichtung mit zwei Ansätzen für die Wasserführung. Der Anschliff muß gut an den Schliff des Mantelrohres anpassen, soll jedoch nicht über $2^1/_2$ cm in dasselb ehineinragen. Am unteren Ende ragt ein an der längeren Seite nicht über $1^1/_2$ cm langer abgeschrägter Stumpf des Steigrohres in den Apparat (St.).

Ad 2. Der Mantel ist ungefähr ebenso breit wie der Kühler, ein 22 cm langer Glaszylinder, der am unteren Ende entweder a) in eine etwa 2 cm weite, ca. 6 cm lange Röhre mit Anschliff für den Kolben, oder b) in eine an der längeren Seite ca. 7 cm lange abgeschrägte Röhre übergeht.

Ad 3. Der Einsatz (Fig. 2) besteht aus einem Glaszylinder von 4 cm innerer Weite, 17 cm Länge, ist unten geschlossen und hat am Boden anschließend ein Heberohr (*H*), das an der Außenseite zweimal knieförmig umbiegend sich eng an den Zylinder anschmiegt, der kürzere Arm ist ca. 14 cm lang, der längere ca. 17 bis 18 cm, gleichfalls am unteren Ende abgeschrägt. Die innere Weite ist 3 bis 4 mm. Zur Stabilisierung des Einsatzes befinden sich an der oberen und unteren Peripherie einige Glaszapfen. Der Raum zwischen Mantel und Einsatz ist also ringsherum rund 0,5 cm breit. Die Entfernung des oberen Heberrohrknies vom oberen Rande des inneren Zylinders 3 cm.

Um plötzliche Überhitzung und Stoßen zu vermeiden, muß der Kolben mindestens 500 ccm (mehr als das Doppelte des Volumens im Einsatz bis zur Biegung des Steigrohres) betragen. Auch ist es gut, am Boden des Einsatzes ein Flöckchen Glaswolle zu legen.

Die Funktion des Apparates dürfte nach einem kurzen Blick auf die nebenstehende Figur klar sein. Dem Apparat wird durch ein Wasserbad Wärme zugeführt. Der verdampfende Äther steigt im Mantelraum bis zum Kühler auf, kondensiert sich dort und tropft in den Einsatz herab. Dort sammelt er

sich, bis sein Niveau das obere Knie des Heberrohres überschreitet, worauf er beladen mit dem Extrakte durch die Wirkung des Hebers fast vollständig wieder in den Kolben abgesaugt wird wie beim Soxhlet-Apparat, worauf das Spiel von neuem beginnt.

Das wesentliche ist aber hier, daß der ringsum im Mantelraum aufsteigende Ätherdampf (beim „Soxhlet" steigt er in einer außen befindlichen Röhre auf) einen großen Teil seiner Kondenswärme an den Einsatz abgibt und dessen Inhalt (mit dem wieder kondensierten Äther) auf einer nahe der Siedetemperatur des Äthers befindlichen Wärmestufe (rund 30°) konstant erhält.

Die zu extrahierende Substanz wird in bekannter Weise in unten und seitwärts geschlossene Zylinder aus starkem reinstem Filtrierpapier gefüllt. Das Papier muß stark und dicht sein, da der Zug beim Absaugen ein ziemlich kräftiger ist.

Der hier beschriebene Apparat wurde in seinen Dimensionen für Äther (Siedepunkt 35°) berechnet. Für Manipulationen mit anderen, zwar höher aber doch noch auf dem Wasserbad leicht siedenden Mitteln, wie Chloroform (62°), Äthylalkohol (79,4°), Benzol (80°) und Schwefelkohlenstoff (46°) usw., wäre er gleichfalls zu benutzen, doch wäre dann eine Verlängerung resp. Verkürzung des Heberohres je nach der beabsichtigten Temperatur anzubringen, wobei z. B. bei dem feuergefährlichen Schwefelkohlenstoff auch der Kühler zu verstärken wäre. Auch zur quantitativen Fettbestimmung kann der Apparat verwendet werden, wobei der Apparat den Vorteil des rascheren Arbeitens für sich hat.

Die gesamte im Apparat befindliche Flüssigkeit soll nie mehr als etwas über die Hälfte des Kolbenvolumens (also nicht über 280 ccm) betragen. Auch ist wegen der starken Extraktionswirkung, wobei es rascher zur Übersättigung und Niederschlagsbildung im Kolben kommt, eine gute Kontrolle und rechtzeitige Entfernung des Niederschlages resp. Wechseln des Kolbens notwendig.

Der Apparat wurde für meine bisherigen Bedürfnisse aus Glas angefertigt, doch wäre eine Anwendung des Prinzips mit anderem Material für andere Zwecke ganz gut möglich.

Eine Farbenreaktion im Harne Kachektischer.

Von

Otto Gaupp.

(Aus der Med. Klinik der Akademie für prakt. Medizin zu Düsseldorf.)

(Eingegangen am 10. August 1908.)

In den Therap. Monatsheften 1905 berichtete C. Strzyzowski über eine Urinreaktion, die häufig bei schwerem Diabetes auftritt und von schlechter prognostischer Bedeutung sein sollte. Die Reaktion selbst bestand darin, daß im Urin nach Zusatz einer 5%igen Lösung des offizinellen Formaldehyds im Verlauf von 24 bis 48 Stunden bei Zimmertemperatur ein grün-fluorescierender Farbstoff entsteht.

Weitere Untersuchungen desselben Autors[1]) zeigten dann, daß die Stärke der Reaktion mit dem Gehalt des Urins an Acetessigsäure Hand in Hand zu gehen pflegt.

Schilling[2]) unterzog die Resultate einer Nachprüfung und fand, daß nur bei Zuckergehalt von über 4% die Reaktion positiv ausfiel, doch gab mit Hefe vergorener Urin, bei dem die Reaktion anfänglich vorhanden war, auch nachher die Reaktion, so daß dem Zuckergehalt an sich kein Einfluß auf das Eintreten der Reaktion beizumessen ist. Weiterhin spricht Schilling dem Aceton und der β-Oxybuttersäure jeglichen Anteil an dem Zustandekommen der Reaktion ab; er glaubt, daß es sich um einen bisher unbekannten Farbstoff handeln müsse.

Auch Kühn[3]) glaubt nach seinen Untersuchungen annehmen

---

[1]) Strzyzowski, Pharmaz. Post 49, Nr. 1.

[2]) F. Schilling, Centralbl. f. inn. Med. 1905.

[3]) Kühn, Münch. med. Wochenschr. 1907, Nr. 27.

zu müssen, daß die Reaktion bedingt sei durch ein unbekanntes, dem Diabetes spezifisches Stoffwechselprodukt.

Ich habe mich ebenfalls längere Zeit mit dieser Reaktion beschäftigt und schon kurz in der Rheinisch-Westfälischen Gesellschaft für Innere Medizin und Nervenheilkunde[1]) meine damaligen Resultate mitgeteilt.

Was die Verhältnisse bei Diabetes anlangt, so kann ich im großen und ganzen die Resultate der früheren Untersucher bestätigen. Doch glaube ich, was gerade die prognostische Seite der Reaktion anlangt, im Gegensatz zu anderen Untersuchern, wie: Strzyzowski[2]), Rabow[3]), einige Einschränkungen machen zu müssen; so beobachte ich jetzt, um nur ein Beispiel anzuführen, eine Patientin mit Diabetes schon ein ganzes Jahr, die die Reaktion ununterbrochen gibt bei leidlichem Wohlbefinden.

Weiter ist zu erwähnen, daß ich meine Untersuchungen auch auf andere Krankheiten ausgedehnt habe und daß ich bei der Mehrzahl der mit Kachexie einhergehenden Krankheiten ebenfalls positiven Ausfall der Reaktion bekam. Z. B. war ein positiver Ausfall der Reaktion bei vielen Lungenphthisen im Endstadium, bei Magen- und Lebercarcinomen usw. zu verzeichnen, es handelte sich also immer um Fälle, die mit starkem Eiweißzerfall einhergehen.

Michaud[4]) zieht aus seinen Untersuchungen den Schluß, daß die Reaktion lediglich auf die Zersetzung der Acetessigsäure durch Formaldehyd zurückzuführen sei, auch wies er nach, daß weder Acet- noch Benzaldehyd die Reaktion bewirken. Ich kann ihm darin beistimmen, daß eine Zersetzung der Acetessigsäure durch Formaldehyd stattfindet, denn auch wir sahen im Urin die vorher positive Eisenchloridreaktion verschwinden. Doch ist es uns nie gelungen, durch Zusammenbringen von Formalin und Acetessigsäure in vitro die Reaktion hervorzurufen, während nach Zusetzen von Formaldehyd und Acetessigsäure zu normalem Urin der grün-fluorescierende Farbstoff, wenn auch in geringen Mengen, regelmäßig entstand.

---

[1]) Gaupp, Münch. med. Wochenschr. 1908, Nr. 24.
[2]) Strzyzowski, Pharmaz. Post 49, Nr. 1.
[3]) J. Rabow, Therap. Monatsh. 1905.
[4]) Michaud, Arch. f. klin. Med. 92.

Weiter fiel, wie schon erwähnt, bei Urinen, die z. B. von Patienten mit Magencarcinomen stammten, die Reaktion meistens sehr deutlich aus, trotzdem die Eisenchloridreaktion gerade positiv war.

Es schien nach alledem noch nicht ganz sichergestellt zu sein, daß nur die Acetessigsäure allein die Ursache für das Zustandekommen dieser Reaktion ist, sondern es lag die Frage nahe, welcher weitere Bestandteil des Urins von Kachektischen spielt bei dem Auftreten der Reaktion noch eine Rolle. Es kommen hier verschiedene Endprodukte des Eiweißstoffwechsels in Betracht und da allen den vorhin erwähnten Krankheiten gemeinsam ist, daß bei ihnen der Ammoniakgehalt im Urin vermehrt ist (vgl. v. Noorden, Handb. d. Pathol. u. d. Stoffwechsels), so lag die Annahme nahe, daß derselbe bei dem Zustandekommen der Reaktion mitbeteiligt sein könnte.

Wir brachten deshalb Acetessigesther, Ammoniak und Formalin im Verhältnis des Molekulargewichts, also wie 13 : 17 : 46 zusammen und sahen im Verlauf einer Stunde einen grünfluorescierenden Farbstoff entstehen, der noch an Intensität zunahm, gleichzeitig bildete sich öfters ein gelber Niederschlag, der aber durch Fällung mit reichlich bas. Bleiacetat und Ammoniak leicht entfernt werden konnte, und man erhielt nach Abfiltrieren des Niederschlages die prachtvoll grün-fluorescierende Lösung. Bemerken möchte ich noch, daß, wenn man die Acetessigsäure durch andere Säuren, wie Essig-, Milch-, Ameisensäuren usw., ersetzte, die Reaktion ausblieb. Merkwürdig war auch, daß die Reaktion nie in der Stärke hervorgerufen werden konnte wie bei dem Anstellen derselben mit Urin.

Um nun mit Sicherheit den Anteil des Ammoniaks an der Bildung des Farbstoffes im Urin nachzuweisen, entfernten wir (vgl. Neubauer und Vogel, Analyse des Harns) durch Fällen mit Phosphorwolframsäure den Ammoniak aus dem sauren Urin, welcher die Reaktion vorher deutlich gegeben hatte, filtrierten und neutralisierten die zugesetzte Salzsäure mit Natronlauge, setzten dann Formaldehyd zu. Wir konnten nun konstatieren, daß die Reaktion selbst nach tagelangem Stehen ausblieb, nach Zusatz aber von 1 ccm $10^0/_0$igen Ammoniaks zu ungefähr 100 ccm des so vorbehandelten Urins trat nach Verlauf von kurzer Zeit die Reaktion deutlich auf.

Auch der abfiltrierte Niederschlag von Phosphorwolframsäure in verdünnter Natronlauge gelöst und filtriert gab nach Zusatz von 5 Tropfen Acetessigesther und 2 ccm 40 %igen Formalins nach einigen Stunden deutlich die Reaktion. Hiernach kann es keinem Zweifel unterliegen, daß sowohl die Acetessigsäure wie der Ammoniak an der Bildung dieses Farbstoffes mit beteiligt sind.

Es ist uns auch gelungen mit einiger Modifikation der Methode Strzyzowskis, den Farbstoff rein darzustellen, und zwar sowohl aus Diabetikerurin wie aus der sozusagen synthetisch dargestellten Lösung.

In ihrem chemisch-physikalischen Verhalten stimmen beide Körper völlig überein.

Der Farbstoff bildet keine Krystalle, sondern ist ein rotbrauner, lackartiger Körper. Er löst sich leicht in Wasser, Chloroform, Alkohol, Essigäther, Benzol, weniger leicht in Toluol, Äther und Xylol, gar nicht in Petroläther. Die wässerige Lösung war optisch völlig inaktiv, sie absorbierte aber den rechten Teil des Spektrums bis zur Linie F.

Die Fluorescenz war am deutlichsten vor schwarzem Schirm und im Magnesiumlicht, vor dem Röntgenschirm trat kein Fluorescieren auf.

Das Resultat meiner Arbeit möchte ich noch einmal dahin zusammenfassen: Die von Strzyzowski beschriebene Urinreaktion ist nicht spezifisch für Diabetes, sondern findet sich bei der Mehrzahl der mit Kachexie einhergehenden Krankheiten. Ihr Auftreten ist an den vermehrten Ammoniakgehalt des Urins bei gleichzeitig vorhandener Ausscheidung von Acetessigsäure gebunden.

Beweis dafür ist, daß es gelingt, durch Zusammenbringen von Ammoniak, Acetessigsäure und Formaldehyd die Fluorescenz künstlich hervorzurufen.

Die weitere genaue ehemische Analyse des Körpers bleibt einer späteren Arbeit vorbehalten.

Zur Kenntnis der „Glucothionsäure“.

Von

J. A. Mandel, New York, und C. Neuberg, Berlin.

(Aus der Chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

Zu den normalen Bestandteilen zahlreicher Organe gehört nach den Untersuchungen von J. A. Mandel und P. A. Levene[1]) die „Glucothionsäure“.

Die Gewinnung der Substanz beruht darauf, daß das zerkleinerte Organ mit 10%iger Kochsalzlösung zwei Stunden gekocht, mit 5% Natriumacetat versetzt und nach dem Abkühlen 12 Stunden lang mit Natronlauge von 10% stehen gelassen wird. Nach dem Ansäuern mit Essigsäure wird gesättigte Pikrinsäurelösung hinzugefügt; das Filtrat der Pikrinsäurefällung wird mit Alkohol niedergeschlagen, wobei sich Nucleinsäure und „Glucothionsäure“ abscheiden. Dieser Niederschlag wird in Natronlauge gelöst und mit Essigsäure stark angesäuert, durch Papiermasse auf einer Nutsche filtriert und dann mit Kupferchlorid gefällt, wobei unlösliches nucleinsaures Kupfer entsteht. Aus dem Filtrat desselben schlägt Alkohol das Kupfersalz der „Glucothionsäure“ nieder. Nach dem Auswaschen wird diese Fällung in verdünnter Salzsäure gelöst und von neuem mit Alkohol versetzt, wodurch nun die freie „Glucothionsäure“ erhalten wird. Dieselbe soll durch inniges Verreiben mit Eisessig, der anhaftendes Eiweiß sowie Nucleinsäure löst, von Verunreinigungen befreit worden. Schließlich wird noch einmal aus wässeriger Lösung durch Alkohol umgefällt.

Nach diesem Verfahren erhielten Mandel und Levene

[1]) J. A. Mandel und P. A. Levene, Zeitschr. f. physiol. Chem. 45, 386, 1905.

die „Glucothionsäure" aus der Niere, der Leber, der Milchdrüse und dem Pankreas, und zwar sollen die Präparate in allen Eigenschaften mit der Substanz aus der Milz übereinstimmen, die Levene[1]) nach demselben Verfahren aus diesem Organe dargestellt hat.

Über die chemische Natur der „Glucothionsäure" ist wenig bekannt, selbst ihre elementare Zusammensetzung steht nicht fest. Es liegen hauptsächlich Schwefel- und Stickstoffbestimmungen vor.

Der folgende prozentische Gehalt ist angegeben[2]) für die freie „Glucothionsäure" aus

	N	S
Leber	2,71 bis 4,93	1,42 bis 3,69
Leukocyten[3])	4,66	3,07
Milchdrüse	4,38	2,65
Milz	5,43	3,00
Niere	4,99	3,94
Pankreas	4,65	2,43

und für das Bariumsalz der Substanz aus

	N	S	Ba
Milchdrüse . .	3,18	3,48	9,81
Sehnenmucin[4])	2,80	4,85	19,02

Als sicher definiertes Spaltungsprodukt ist bisher allein bei der Hydrolyse mit Salzsäure die Schwefelsäure erhalten, die zweifellos in Form einer gepaarten Säure vorhanden ist.

Ferner ist die Gegenwart einer oder mehrerer Kohlenhydratgruppen dargetan; denn nach der Hydrolyse reduziert die „Glucothionsäure" die Fehlingsche Lösung.

Die Substanz aus Sehnenmucin gibt die Orcinprobe und bei Salzsäuredestillation Furfurol; nach der Hydrolyse er-

[1]) P. A. Levene, Zeitschr. f. physiol. Chem. 37, 400, 1903.
[2]) J. A. Mandel und P. A. Levene, Zeitschr. f. physiol. Chem. 45, 386, 1905.
[3]) J. A. Mandel und P. A. Levene, diese Zeitschr. 4, 78, 1907.
[4]) P. A. Levene, Zeitschr. f. physiol. Chem. 39, 1, 1903.

hielt Levene[1]) mit p-Bromphenylhydrazin ein von der entsprechenden Glucuronsäureverbindung verschiedenes Osazon. Die Substanz aus der Milz gab bei der Salzsäuredestillation nur eine geringe Furfurolmenge und eine atypische Orcinprobe. Aus der hydrolytisch gespaltenen Säure stellte Levene ein Hexosazon vom Schmelzpunkt 205° dar.

Spuren von Furfurol und ein bei 196° schmelzendes, aber nicht analysiertes Osazon gewannen Mandel und Levene aus der „Glucothionsäure" der Milchdrüse.

Diese Zusammenstellung lehrt, daß die „Glucothionsäuren" verschiedener Herkunft eine recht ungleiche Zusammensetzung aufweisen. Die als charakteristisch betrachteten Zahlen für Stickstoff und Schwefel differieren um mehr als hundert Prozent voneinander.

Die Identität dieser Säuren ist deshalb wohl unbewiesen. Es ist jedoch möglich, daß sie trotzdem besteht und die Abweichungen durch die Schwierigkeit der Reindarstellung bedingt sind.

Die vorhandenen Daten sind viel zu dürftig, um an die Aufstellung einer Bruttoformel für „Glucothionsäure" zu gehen.

Bevor man überhaupt hieran denken kann, ist es nötig, die Einheitlichkeit der „Glucothionsäure" zu prüfen. Denn es besteht nach den so erheblich differierenden analytischen Zahlen für N und S ein starker Verdacht, daß hier Gemische vorliegen.

Für diese Prüfung wählten wir die ziemlich leicht erhältliche „Glucothionsäure" aus Nieren (vom Rind), die der eine von uns (M.) genau nach der von ihm gemeinsam mit Levene mitgeteilten Vorschrift hergestellt hatte.

Die Substanz zeigte das Aussehen und die Eigenschaften, die allgemein für „Glucothionsäure" angegeben sind.

Der Stickstoffgehalt war 4,53 %,

der Schwefelgehalt war 2,63 %.

Die qualitative Prüfung ergab das Vorhandensein von Schwefelsäure in gepaarter Form. Erst nach voraufgegangenem Kochen mit Salzsäure erzeugte Bariumchlorid eine Fällung von Bariumsulfat.

Zu unserer Überraschung erwies sich die Substanz auch als beträchtlich phosphorhaltig.

[1]) l. c.

Die zur Gewichtskonstanz getrocknete Verbindung enthielt 1,34 % P oder 3,07 % P_2O_5.

Es lag nahe, eine Verunreinigung mit einer Nucleinsäure anzunehmen. Obgleich das Präparat bereits der auf eine Beseitigung von Nucleinsäure abzielenden Behandlung mit Eisessig und darauffolgender Umfällung aus Wasser genau nach Levenes Vorschrift unterworfen war, wurde diese Prozedur wiederholt. Aber weder hierdurch noch durch eine fraktionierte Fällung mit Phosphorwolframsäure usw. gelang eine Trennung in einen phosphorfreien und phosphorhaltigen Anteil. Daraus muß man schließen, daß entweder die bisherige Methode zur Darstellung von „Glucothionsäure" unzureichend oder daß der Phosphor ein früher übersehener Bestandteil der „Nierenglucothionsäure" ist.

In welcher Form der in den „Glucothionsäuren" jeglicher Herkunft gefundene Stickstoff (N = 2,71 bis 5,43 %) zugegen ist, darüber liegen bis jetzt keinerlei Angaben vor.

Nach 10stündiger Hydrolyse mit siedender verdünnter Schwefelsäure von 2 % erhält man eine Lösung, in der nach Filtration von wenig Huminstoffen Phosphorwolframsäure eine starke Fällung organischer Stickstoffverbindungen erzeugt. Mit ammoniakalischer Silberlösung entsteht gleichfalls ein massiger Niederschlag. Durch Zerlegung beider erhält man Purine, darunter ein durch Pikrinsäure fällbares. Eine Aufteilung derselben lag nicht im Plane dieser vorläufigen Untersuchung, ebenso unterblieb die Prüfung auf Pyrimidine.

Weitere orientierende Versuche betrafen die Natur der Kohlehydratgruppe. Ob eine solche in der „Nierenglucothionsäure" vorhanden ist, war bisher nicht festgestellt.

Der positive Ausfall der Molisch-Udrańskyschen Probe und der Tollensschen Orcinreaktion[1]) zeigten die Gegenwart einer Zuckerkomponente an.

Weiter stellten wir fest, daß die Säure im Gegensatz zu der entsprechenden Verbindung aus Milz und Milchdrüse bei der Salzsäuredestillation nach Tollens relativ reichlich Furfurol, mindestens 5 %, ergibt.

---

[1]) Letztere verlief durchaus typisch im Gegensatz zu Levenes Angaben für die „Glucothionsäure" aus der Milz. Zeitschr. f. physiol. Chem. 37, 401, 1903

Die Hydrolyse mittels verdünnter Schwefelsäure (10stündiges Erhitzen am Rückflußkühler zum Sieden mit 2%iger H_2SO_4) lieferte eine Fehlingsche Lösung intensiv reduzierende Flüssigkeit.

Zur Prüfung auf Traubenzucker wurde dieselbe mit Bariumcarbonat in gelinder Wärme neutralisiert, filtriert, eingeengt und dann mit wirksamer Hefe in ein Gärungsröhrchen gebracht. Der Ausfall der Gärungsprobe war völlig negativ. Durch einen Zusatz von 1% Traubenzucker, der lebhafte Gärung zur Folge hatte, überzeugten wir uns, daß keine gärungshemmenden Stoffe zugegen waren. Für die Anwesenheit von d-Glucose unter den Spaltungsprodukten der „Glucothionsäure" aus Nieren ergab sich demnach kein Anhaltspunkt.

Das Reduktionsvermögen ist nun, wenigstens zum Teil, durch eine reduzierende Kohlenhydratsäure bedingt. Denn aus der mit Bariumcarbonat neutralisierten und dann eingeengten Flüssigkeit fällt starkes Barytwasser einen feinflockigen gelben Niederschlag eines basischen Salzes. Nach dem Auswaschen wurde es mit verdünnter Schwefelsäure zersetzt, durch Neutralisation mit kohlensaurem Baryt in neutrales Salz verwandelt, filtriert, eingeengt und mit Alkohol gefällt. Das Bariumsalz ist in wässeriger Lösung rechtsdrehend, stickstofffrei (Lassaignesche Probe mit Kalium) und reduziert stark die Fehlingsche Mischung. Es gibt die Orcinreaktion und die neue Farbenprobe mit Naphtoresorcin, Salzsäure und Äther, die jüngst B. Tollens[1]) für Glucuronsäure beschrieben hat. Trotz mancher Ähnlichkeit möchten wir die Identität unseres Spaltungsproduktes der „Glucothionsäure" aus Nieren mit der d-Glucuronsäure nicht als erwiesen betrachten; zur Analyse reichte das Material an gereinigtem Bariumsalz nicht aus.

Bezüglich der Eigenschaften der freien „Glucothionsäure" aus Nieren sei noch erwähnt, daß sie rechtsdrehend ist und in prächtiger Weise die Naphtoresorcinprobe[2]) auch vor der Hydrolyse durch Mineralsäuren gibt.

Letztere wird übrigens auch durch Alkalien bewirkt, ein Punkt, der für die Beurteilung der Bindungsverhältnisse von Wichtig-

---

[1]) B. Tollens, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 41, 1788, 1908.

[2]) Siehe darüber die folgende Mitteilung.

keit ist. Z. B. wird beim Erwärmen mit 10%iger Natronlauge im Wasserbade bald Alkalisulfat abgespalten, und die gelbe Flüssigkeit reduziert zunächst die Fehlingsche Lösung, während nach einiger Zeit das Kohlehydrat unter Braunfärbung zersetzt wird.

Die voraufgehend mitgeteilten Versuche haben lediglich einen orientierenden Charakter, sie zeigen nur, wo die Forschung über die noch recht unsichere Chemie der „Glucothionsäure“ einzusetzen hat.

Die erste Aufgabe wird darin bestehen, die Einheitlichkeit der „Glucothionsäure“ zu untersuchen. Gegen eine solche sprechen auch — nach den Angaben der Literatur — die Befunde von Mandel und Levene[1]) bei der Säure aus der Milchdrüse (siehe auch die Tabelle S. 143).

Während nämlich die freie Säure einen Schwefelgehalt von 2,65 % besitzt, weist ihr Bariumsalz einen Schwefelgehalt von 3,48 % auf (Durchschnittswert mehrerer Analysen); demnach scheint bei der Salzbildung eine Fraktionierung zu erfolgen.

Schließlich möge noch eine Bemerkung zur Nomenklatur Platz finden. Der Name „Glucothionsäure“ erweckt den Anschein, als ob die Säure eine Schwefelverbindung des Traubenzuckers wäre, so wie die Glycerinphosphorsäure eine Vereinigung der Komponenten darstellt. Nun enthält sie einmal überhaupt keine Glucose unter ihren Spaltungsprodukten; dann ist die Bezeichnung „Thionsäure“ für die Säuren mit polysulfidartiger Bindung (Dithionsäure, Tetrathionsäure, Pentathionsäure usw.) reserviert, während in den „Glucothionsäuren“ doch einfach eine gepaarte Schwefelsäure vorliegt. Ob ferner die Schwefelsäure direkt an der Kohlehydratgruppe haftet, ist gleichfalls noch ungewiß. Es empfiehlt sich deshalb wohl, an Stelle der irreführenden Bezeichnung „Glucothionsäure“ eine Benennung analog der Chondroitinschwefelsäure einzuführen, vielleicht vorläufig nach dem Ort der Herkunft, im vorliegenden Falle also kurz: Renoschwefelsäure.

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 45, 389 u. 390, 1905.

Naphtoresorcin als Reagens auf einige Aldehyd- und Ketosäuren.

Von

J. A. Mandel, New York, und C. Neuberg, Berlin.

(Aus der Chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

Vor kurzem hat B. Tollens[1]) eine prachtvolle Farbenreaktion auf Glucuronsäure beschrieben. Sie besteht darin, daß Glucuronsäure oder Glucuronsäure abgebende Materialien mit Naphtoresorcin und rauchender Salzsäure gekocht und nach dem Abkühlen mit Äther geschüttelt werden. Die Ätherschicht färbt sich dann blau, blauviolett, rotviolett, bei Verwendung glucuronsäurehaltiger Harne auch rot und zeigt bei passender Konzentration eine rechts an und auf der D-Linie liegendes Band im Spektrum.

Die mit den eigentlichen Zuckerarten, auch mit den Pentosen plus Naphtoresorcin und Salzsäure entstehenden Färbungen[2]) gehen dagegen nicht in den Äther über,[3]) so daß

[1]) B. Tollens, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 41, 1788, 1908.

[2]) B. Tollens, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 41, 1783, 1908.

[3]) Dieses verschiedene Verhalten ist übrigens ein neues Argument für die von einem von uns öfter vertretene Ansicht (C. Neuberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 564, 1901; Ergebn. d. Physiologie 3, 373, 1094; Handb. d. Biochem. 1, 159, 1908), daß die Farbenproben der Zucker mit Phenolen nicht auf einer Bildung von Furfurol beruhen, wie vielfach irrigerweise angenommen wird. Zwar liefern Pentosen und Glucuronsäure bei der Salzsäuredestillation in gleicher Weise Furfurol; aber die Reaktionen von Furfurol mit Phloroglucin und Orcin sind von denen der Fünfkohlenstoffzucker und der Glucuronsäure verschieden. Die Ätherlöslichkeit des Produktes aus Naphtoresorcin und Glucuronsäure zeigt ebenfalls, daß letztere (= Carboxy-xylose) sich ganz anders als die Xylose verhält. Übrigens fanden wir, daß Furfurol mit Naphtoresorcin und Salzsäure eine anfangs fuchsinrote, später violette Fällung gibt, die sich schwach gelbbraun bis gelbgrün in Äther löst und von der Reaktion der Pentosen und der Glucuronsäure völlig verschieden ist.

hierdurch im Gegensatz zu der alten Orcin- und Phloroglucinreaktion eine Differenzierung der Glucuronsäure von den Fünfkohlenstoffzuckern möglich ist.

Für zahlreiche Fragen der physiologischen Chemie ist ein einfacher und schneller Nachweis der Glucuronsäure von größter Wichtigkeit. Deshalb schien es uns nötig, die Eindeutigkeit der neuen Tollensschen Naphtoresorcinreaktion zu prüfen.

Die ersten Zweifel an ihrer Beweiskraft erregten die Ergebnisse von C. Tollens[1]) über das häufige Auftreten der Reaktion im menschlichen Harn. Er konstatierte in 40 von 60 Fällen einen, wenn auch zum Teil schwach positiven Ausfall der Probe bei Patienten, die keine Medikamente erhalten hatten und — von geringfügigen äußeren Verletzungen oder rheumatischen Erscheinungen abgesehen — normal waren. An sich ist dieses Resultat nicht auffallend, denn nach den Feststellungen von P. Mayer und C. Neuberg[2]) ist Glucuronsäure in gepaarter Form in geringer Menge ein normaler und bei Verarbeitung hinreichender Quantitäten nachweisbarer Harnbestandteil. Nun aber erhält man nach eigenen zahlreichen Erfahrungen keineswegs bei $^2/_3$ aller untersuchten Harne einen positiven Ausfall der alten B. Tollensschen Orcinreaktion, obgleich dieselbe (nach einigen orientierenden Versuchen) an sich keinesfalls weniger empfindlich als die neue Naphtoresorcinprobe, eher schärfer ist. Da die Orcinreaktion ja bekanntlich auch von den Pentosen gegeben wird, sollte man um so mehr ein häufiges, positives Auftreten mit Harn erwarten. Das ist aber nicht der Fall.

Von Substanzen, die ev. mit Naphtoresorcin und Salzsäure wie die Glucuronsäure reagieren könnten, mußte man zunächst die analogen Aldehyd- und Ketosäuren in Betracht ziehen.

Tatsächlich zeigte sich sofort, daß die der Glucuronsäure isomere Aldehydschleimsäure, $C_6H_{10}O_7$, von E. Fischer[3]) die gleiche Färbung annimmt.

Bemerkenswert ist, daß außer den Säuren der 6-Kohlen-

[1]) C. Tollens, Zeitschr. f. physiol. Chem. 56, 115, 1908.

[2]) P. Mayer und C. Neuberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. 29, 256, 1900.

[3]) E. Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 23, 937, 1890 und 24, 2136, 1891.

stoffreihe auch die niedrigeren Glieder sich ebenso verhalten. Wie vor kurzem von Neuberg[1]) mitgeteilt worden ist, können die Ketosäuren der allgemeinen Formel $CH_2OH—(CHOH)_n—CO—COOH$, die bisher nur schwer zugänglich waren, durch Elektrolyse der entsprechenden Oxysäuren

$$CH_2OH—(CHOH)_n—CHOH—COOH$$

gewonnen werden. Die Säuren der C_7- bis C_3-Reihe geben sämtlich mit Naphtoresorcin und Salzsäure eine Fällung, die sich in Äther mit schön blauer bis violettroter Farbe löst. Ebenso verhält sich eine aus Erythrit gewonnene Säure $C_4H_6O_5$ der Formel COOH—CHOH—CHOH—CHO bzw. COOH—CO—CHOH—CH_2OH bzw. COOH—CHOH—CO—CH_2OH[2]) sowie die Aldehydglycerinsäure CHO—CHOH—COOH. Auch der einfachste Vertreter der Aldehydsäuren, die Glyoxalsäure CHO—COOH, die im tierischen Organismus vorkommt und in Pflanzen weit verbreitet ist, nimmt eine prächtige Färbung an. Dieselbe ist anfangs fuchsinrot, wird beim Abkühlen blauviolett und geht mit dieser Nuance in den Äther über.

Sämtliche Ätherlösungen weisen ein ungefähr bei der D-Linie anfangendes Absorptionsband auf, das in vielen Fällen von dem der Glucuronsäure nicht zu unterscheiden ist. Jedoch ist es möglich, daß eine genaue spektrographische Messung Differenzen ergibt. Das Absorptionsband, das bei Anwendung von Glyoxalsäure auftritt, beginnt gleichfalls in der Gegend der D-Linie, ist verwaschener und erstreckt sich weiter nach dem violetten Ende hin.

Bei glucuronsäurehaltigen Harnen und Flüssigkeiten physiologischer Herkunft ist übrigens, wie auch schon Tollens angibt, die Begrenzung des Absorptionsbandes nach der violetten Seite hin nicht immer scharf.

Weiter haben wir konstatiert, daß die Reaktion mit einer ganzen Reihe von Substanzen positiv ausfällt, wenn sie zuvor mit geeigneten Oxydationsmitteln behandelt sind; hierhin gehören die Weinsäure, Zuckersäure, Schleimsäure, Glucosamin, Chitonsäure, Isozuckersäure, Gluconsäure, Stärke, Glykokoll, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Inosit, Guanin. Über die

[1]) C. Neuberg, Diese Zeitschr. 7, 527, 1908.

[2]) Über diese verschiedenen Aldehyd- und Ketosäuren wird demnächst berichtet werden; siehe auch die Dissertation von L. Scott, Berlin 1908.

Natur der dabei entstehenden und mit Naphtoresorcin ähnlich der Glucuronsäure reagierenden Verbindungen sind Untersuchungen im Gange.

Ferner gibt noch die Brenztraubensäure, CH_3—CO—COOH, und die Mesoxalsäure, COOH—CO—COOH, eine ähnliche Farbenreaktion.

Von einfachen, physiologisch wichtigen Körpern gibt das Allantoin, das Diureid der Glyoxalsäure, das ein häufiger Bestandteil des Harnes ist, die Probe genau wie die Glyoxalsäure, und das Alloxan schließt sich der Mesoxalsäure an.

Auch bei Laboratoriumspräparaten mancher komplizierter Verbindungen fiel die Probe positiv aus, öfter nach voraufgegangener Hydrolyse noch schöner. Es waren dieses:

Glucothionsäure, Ovomucoid, Chondroitinschwefelsäure (nach Oddi hergestellt), Lebernucleoproteid, Milznucleoproteid, Pankreasnucleoproteid.

Es ist jedoch vorläufig unmöglich, eine bestimmte Komponente dieser Verbindungen mit Sicherheit für den Eintritt der Reaktion verantwortlich zu machen, und es ist ungewiß, ob sie diesen Substanzen an sich oder einem in geringfügiger Menge vorhandenen Begleiter zukommt.

Im Gegensatz hierzu geben Inosinsäure, Hefenucleinsäure, Lebernucleinsäure und Milznucleinsäure sowie Amyloïd die Probe nicht.

Nach den vorstehend mitgeteilten Erfahrungen wird man die Naphtoresorcinreaktion nicht mehr als unbedingt beweisend für die Glucuronsäure betrachten können; denn ein natürliches Vorkommen anderer die Probe gebenden Substanzen läßt sich vielfach nicht ausschließen.

Soweit sich bisher beurteilen läßt, scheint für den positiven Ausfall die Gegenwart einer bestimmten Kombination von Carboxyl- und Carbonylgruppe im Molekül notwendig zu sein.

Für die Prüfung auf so konstituierte Körper wird die prächtige neue Naphtoresorcinreaktion von B. Tollens wertvolle Dienste leisten.

Über die chemische Zusammensetzung der peripheren Nerven.

Von

Fritz Falk (Graz).

(Arbeiten aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

(Eingegangen am 17. August 1908.)

I.

Die chemische Untersuchung der sogenannten Lipoide[1]) des peripheren Nervensystems ist bis in die jüngere Zeit herauf zumeist in der Form mikrochemischer Verfahren vorgenommen worden und blieb als solche mehr oder weniger Gegenstand histologischer Forschung. Durch die fortschreitende Entwicklung der mikroskopischen Färbetechnik wurden Verschiedenheiten auch in dem chemischen Verhalten der einzelnen nervösen Gebilde bekannt. Die dabei gesammelten Erfahrungen führten jedoch bloß zu einer weitergehenden morphologischen Differenzierung.

---

[1]) Man gebraucht gegenwärtig allgemein die Bezeichnung „Lipoide" für die hier in Betracht kommenden Körper und versteht darunter Substanzen, die durch organische Lösungsmittel aus den Organen extrahierbar sind. Abgesehen davon, daß eine Einteilung von chemischen Körpern nach dem physikalischen Prinzip der Löslichkeit in bestimmten Medien sonst nicht üblich ist, lassen sich für die speziell in der Nervenchemie interessierenden Stoffe, z. B. das Cholesterin, die Kephaline, Cerebroside kaum gemeinsame chemische Gesichtspunkte aufstellen. Die Lösungsaffinität der Kephalingruppe zu Äther ist anscheinend nicht größer als zu Wasser. Kephalin, in Wasser gelöst oder darin gequollen, kann demselben durch Äther nicht entzogen werden, und doch ist gerade Kephalin unter den „Lipoiden" einer der fettähnlichsten Körper. Im folgenden ist trotzdem die Bezeichnung „Lipoide" mit Rücksicht auf ihre allgemeine Verbreitung verwendet, wo sie nicht zu einer mißverständlichen Auffassung führen kann.

Die Methoden, mit Hilfe welcher man versuchte, Beiträge zur Kenntnis der chemischen Zusammensetzung zu liefern, beschränkten sich vielfach auf die Anwendung histologischer Reaktionen des Nervenmarks, nur zum Teil wurde auch nach rein chemischen Verfahren gearbeitet.

Gad und Heymanns stellten Untersuchungen über das Myelin in markhaltigen und marklosen Fasern an. Es wurden Nervenschnitte mit verschiedenen Extraktionsmitteln vorbehandelt und nachträglich auf das Auftreten zweier Reaktionen geprüft, auf die Schwärzung durch Osmiumsäure und auf das Auftreten sogenannter Myelinformen. Ihre Resultate haben das chemische Verständnis der einzelnen Nervenstoffe kaum gefördert. Sie führten zu dem Schlusse, daß nicht Protagon, sondern Lecithin die Ursache der Myelinformen und der Osmiumschwärzung ist.

Einen ähnlichen Weg schlug Ellermann bei seiner Untersuchung der „Chemie der Myelinstoffe“ ein, nur mit dem Unterschiede, daß er die Schnitte nicht mit den reinen Lösungsmitteln, sondern mit solchen vorbehandelte, die aus dem Gehirn isolierte Substanzen in „gesättigter Lösung“ enthielten. Nachträglich wurden die Schnitte nach einer eigenen Markscheidenmethode gefärbt, um festzustellen, ob die färbbare Substanz extrahiert worden war oder nicht. Die Lösungsmittel waren gesättigt mit Lecithin, Cholesterin, Cerebrin, Kerasin und Protagon. Nach Ellermanns Ergebnissen soll die färbbare Substanz in den Markscheiden mit keinem dieser Stoffe identisch sein, am nächsten aber dem Protagon stehen.

Wlassak machte Angaben über die Mikrochemie des Myelins. Er untersuchte Protagon, Lecithin und freies Fett auf ihre Färbbarkeit mit Osmiumsäure, mit dem Marchischen Reagens und nach der Weigertschen Hämatoxylinmethode. Nach ihm weist die letztere Färbung Protagon nach, Osmiumsäure (auf das frische Gewebe angewendet) Fett und Lecithin und die Marchische Methode freies Fett.

So eingehend und interessant nun eine detaillierte mikrochemische Analyse sein mag, so muß doch gesagt werden, daß Versuche, auf mikrochemischem Wege zu einer Kenntnis der die Nervenelemente zusammensetzenden Grundsubstanzen zu gelangen, so lange als verfrüht zu bezeichnen sind, als die ge-

wöhnliche makrochemische Analyse die einzelnen Stoffe noch nicht isoliert und ihre Eigenschaften festgelegt hat. Dazu ist aber gegenwärtig kaum die erste Grundlage gegeben.

Die Untersuchung der Nerven mit Hilfe eigener chemischer Methoden, in ähnlicher Weise wie sie bei der Bearbeitung des Gehirns in Anwendung kamen, ist nur vereinzelt vorgenommen worden. Es liegen darüber nur Angaben von J. Chevalier, von Noll und von Halliburton vor.

Die erstere untersuchte menschliche Ischiadici. Der Gesamt-Ätheralkoholauszug der Trockensubstanz wurde durch sukzessive Extraktion mit kaltem Alkohol, mit Äther und mit heißem Alkohol in verschiedene Fraktionen getrennt. Jede dieser Fraktionen wurde einzeln zur Bestimmung von Cholesterin, Lecithin, Cerebrin und Fettsäuren einem bestimmten Verfahren unterworfen. Keiner von diesen Körpern kam als solcher zur Wägung, sie wurden nur auf indirektem Wege bestimmt.

In der Cholesterinfraktion wurden neben diesen noch ätherlösliche Seifen erhalten. Lecithin wurde aus dem Phosphorgehalt berechnet und Cerebrin durch Subtraktion der Lecithinzahl von der betreffenden Extraktzahl. Die Angaben bei der Prozentzusammenstellung der Substanzen der weißen Nervenfaser können den heutigen Kenntnissen gegenüber nicht Anspruch auf Genauigkeit machen.

Noll untersuchte die quantitativen Verhältnisse verschiedener Nervenpartien, auch des Nervus ischiadicus (Pferd), speziell mit Rücksicht auf die Anwesenheit von Protagon. Protagon enthält nach der Ansicht vieler Autoren als Spaltungsprodukt Galactose. Aus dem Reduktionsvermögen beim Kochen mit Fehlingscher Lösung wurde in den entsprechenden Extrakten nach Spaltung der Substanz die Menge der Galactose, bzw. des Protagons berechnet.

Bei Halliburton finden wir Bestimmungen des Gehalts an Wasser, Trockensubstanz und Phosphor von normalen und künstlich degenerierten Katzen-Ischiadici, sowie Angaben über die Chemie der Marchi-Reaktion an peripheren Nerven und an isolierten Nerven-Phosphatiden.

Da keine neueren Untersuchungen über die qualitativen und quantitativen Verhältnisse der Lipoide im peripheren Nerven vorliegen, so habe ich es auf Anraten des Herrn Prof. Hofmeister unternommen, dieselben einer strengeren Prüfung — soweit es die gegenwärtigen Kenntnisse erlauben — zu unterziehen.

Nachdem ich an Gehirnmaterial durch eine Reihe von

Untersuchungen die nötige Erfahrung über die in Frage kommenden, immerhin nur unvollkommen charakterisierten Bestandteile des Nervensystems gesammelt und eine vorläufige Methode ausgearbeitet hatte, die es gestattet, die verschiedenen Körpergruppen — denn nur um Gruppen kann es sich vorläufig handeln — möglichst einfach und verläßlich voneinander zu trennen, ging ich an die Analyse der peripheren Nerven.

Es lag im Plane der Arbeit, über die bloße chemische Analyse der Nerven hinauszugehen und durch die Wahl des Materials auch über die Zusammensetzung der zwei wichtigsten anatomischen Bestandteile der Nervenfaser, der Markscheide und des Achsenzylinders Aufschluß zu erhalten. Es lag nahe, zu diesem Zweck einerseits markhaltige, andererseits marklose, sog. Remaksche Nervenfasern zu wählen. Als Vertreter der ersten Kategorie wurden Ischiadici vom Menschen, als Vertreter der zweiten Kategorie die Milznerven vom Rind unter sucht.

Es wurde zunächst auf das Vorhandensein der im Gehirn nachgewiesenen grundlegenden Substanzen geprüft, sodann der Versuch gemacht, eine Vorstellung über ihre quantitative Verteilung in den beiden Nervenarten zu bekommen. Das vom Menschen stammende Material verdanke ich der außerordentlichen Liebenswürdigkeit des Vorstandes des Straßburger pathologisch-anatomischen Instituts, Herrn Prof. Chiari, dem ich auch an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank ausspreche.

II.

Qualitative Untersuchung der markhaltigen Nerven.

Die Vorbereitung des Materials wurde in folgender Weise vorgenommen: Die N. ischiadici wurden frisch von der Leiche bearbeitet, von dem groben umhüllenden und eingeschlossenen Fett- und Bindegewebe befreit, im Brutofen bei einer Temperatur, die 50° nicht überstieg, getrocknet, zerkleinert und nochmals getrocknet. Die Nervenfragmente fühlten sich dann mehr oder weniger fettig an, je nach dem Fettgehalt der Leiche, der sie entnommen waren.

Da die Beimengung von Fett voraussichtlich den Gang und möglicherweise die Resultate der Untersuchung stören konnte, so wurde der systematischen Behandlung eine Prozedur vorausgeschickt, die diese Verunreinigung entfernen sollte.

Dafür kamen zunächst als geeignete Lösungsmittel niedrig siedender Petroläther und Benzol in Betracht. Zu Orientierungszwecken wurde folgender Versuch gemacht:

7,6930 g zerkleinerte getrocknete Nerven wurden mit 100 ccm Petroläther versetzt. Durch dreistündige Einwirkung bei Zimmertemperatur wurden extrahiert: 2,4370 g oder 31,68%. Die parallel vorgenommene Benzolbehandlung extrahierte 28,92%. Zur Prüfung, wieviel von den Phosphatiden resp. Cerebrosiden mit gelöst worden waren, wurden mit gewogenen Mengen des Petroläther- resp. Benzolextrakt-Rückstandes Phosphor- und Stickstoff-Bestimmungen vorgenommen (P nach Neumann, N nach Kjeldahl). Für den Petrolätherextrakt ergaben sich durchschnittlich 0,29% P und 1,2% N; für den Benzolextrakt 0,32% P und 0,96% N. Wie man sieht, entspricht keine dieser Extraktionsmethoden ganz dem ins Auge gefaßten Zwecke, das Fett zu entfernen, ohne Nervensubstanz zu verändern. Immerhin erkennt man, daß bei dieser Form der Vorbehandlung mit Ausnahme von Cholesterin verhältnismäßig wenig spezifische Nervenstoffe mit entfernt werden. Petroläther scheint rascher und tiefer zwischen die Fasern einzudringen und bei prozentuell größerem Gesamtextrakt keine größere Menge Phosphatide auszuziehen. Aus diesem Grund wurde es dem Benzol vorgezogen.

Die von mir angewandte Methode zur Trennung der verschiedenen Gruppen der Nervenstoffe entsprach im allgemeinen der von mir benutzten Darstellungsweise des Kephalins aus dem Gehirn, weshalb das Methodische hier nur soweit dies notwendig erwähnt und im übrigen auf eine nächstens erfolgende Mitteilung über das Kephalin verwiesen werden soll.

Bei dem Hauptversuch wurden ca. 100 g luftrockene Ischiadici mit ca. 1 Liter niedrig siedendem Petroläther 2½ Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. In diesem Auszug wurden neben Fetten Cholesterin und eine geringe Menge von Cerebrosiden nachgewiesen, wodurch der Stickstoffgehalt des Extraktes zum großen Teil gedeckt erscheint. Die weitere Untersuchung des so von Fett befreiten Materials gestaltete sich wie folgt:

Benzolextraktion. Die Flüssigkeit wurde vom Rückstand durch Filtrieren getrennt, der letztere mit Petroläther nachgewaschen und einer gründlichen Benzolextraktion unterworfen. Nachdem die Substanz zweimal mit reichlichen Mengen siedenden Benzols ca. 8 Stunden lang extrahiert worden war, konnte der Rückstand getrocknet, in einer Zerkleinerungsmaschine zu einer flaumigen, feinen Masse verrieben und nochmals extrahiert

werden. Die verschiedenen Extraktflüssigkeiten wurden vereinigt und das Benzol im Vakuum bei ca. 50° vollständig abdestilliert.

Die vereinigten, kalt filtrierten Benzollösungen trübten sich nach längerem Stehen und setzten einen schleimig aussehenden Niederschlag ab. Er wurde abfiltriert und blieb auf dem Filter als durchscheinende, gallertige Masse zurück. Er löste sich nicht in kaltem Alkohol, wurde aber durch diese Behandlung opak, wachsartig. Der so isolierte Körper war anfangs löslich in heißem Äther und heißem Alkohol, woraus er beim Erkalten ausfiel. Nach öfterem Reinigen mit Äther wurde er darin unlöslich. Er schmilzt bei 205°. Mit konz. Schwefelsäure verrieben löste er sich mit gelber Farbe, die feinen ungelösten Partikelchen gaben bei vorsichtigem Erwärmen eine purpurrote Färbung (Oleo-Cholid-Reaktion). Nach Kochen mit verdünnter Salzsäure reduzierte die Substanz Kupferoxyd. Sie war phosphorfrei und enthielt Stickstoff. Es handelte sich sonach um einen der Cerebrosidgruppe angehörenden Körper.

Acetonbehandlung. Der Benzolrückstand wurde zur Entfernung des Cholesterins dreimal mit Aceton gründlich ausgekocht und heiß filtriert; das letzte Filtrat war kaum gefärbt. Beim Erkalten des Filtrats setzte sich ein weißer feiner Niederschlag ab. Es handelt sich gleichfalls um ein Cerebrosid. Der in Aceton unlösliche Rückstand war eine weiße, wenig harzige Masse.

Ätherbehandlung. Diese Masse wurde mit entsprechenden Mengen Äther übergossen. Es bildete sich eine milchige Flüssigkeit, aus der sich beim Stehen im Eisschrank reichlich ein weißes krystallinisches Pulver absetzte. Dieses wurde durch Zentrifugieren von der klaren gelben Lösung getrennt, durch öfteres Nachspülen mit Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Substanz hatte jetzt ein wachsartiges Aussehen und ließ sich zu einem feinen weißen Pulver verreiben. Sie stellte die Hauptmasse der Cerebroside dar.

Alkoholfällung. Die ätherische Lösung wurde im Vakuum etwas eingeengt und mit der fünffachen Menge abs. Alkohols gefällt. Es fiel ein schöner, weißer, flockiger Niederschlag aus. Dieser wurde durch Abzentrifugieren getrennt, mit abs. Alkohol öfters verrührt und wieder zentrifugiert, schließlich

über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet. Er wurde so in Form einer weißen festen Masse erhalten, die sich pulverisieren ließ. Es handelte sich um die Hauptmenge der Kephaline. Wenn die Ätheralkohollösung nicht ganz klar war, so wurde sie im Vakuum vom ätherischen Anteil befreit, worauf meist die Ausfällung vollständig wurde.

Nun konnte die in Lösung befindliche Substanz im Vakuum von Alkohol befreit, nochmals mit wenig Äther gelöst und mit Alkohol gefällt werden. Meist erhielt man dabei noch Niederschläge, die wie oben behandelt wurden.

Die weitere Fraktionierung der nach Abdestillieren des Äthers in alkoholischer Lösung befindlichen Stoffe war durch Lösungsmittel allein nicht mehr möglich. Zur weiterer Gruppentrennung wurde die Affinität der einzelnen Gruppen zu bestimmten Metallsalzen benutzt.

Zum Zweck systematischer Trennung der Gehirnbestandteile sind Metallsalze hauptsächlich von Thudichum eingeführt worden. Er hat gezeigt, daß sich mit Hilfe von Chlorcadmium, von basischem Bleiacetat und von Platinchlorid aus der Gruppe der phosphorhaltigen Substanzen mehrere Körper trennen lassen, die untereinander Löslichkeitsverschiedenheiten zeigen. Er hat auf diese Weise aus dem Gehirn eine Reihe von bis dahin unbekannten Substanzen isoliert, zum Teil analysiert und hydrolysiert und mit eigenen Namen belegt. Es liegt der vorliegenden Untersuchung fern, auf diese Substanzen einzugehen, und dies um so mehr, als infolge der gewonnenen geringen Substanzmengen von einer Kontrolle der Thudichumschen Befunde nicht die Rede sein konnte. Es mußte daher vorläufig von einer ausführlichen chemischen Charakterisierung solcher Körper abgesehen und diese auf die Angabe der typischen Metallsalzfüllungen und ihrer Löslichkeitsbeziehungen beschränkt werden.

Es war die Hauptaufgabe der weiteren Trennung, aus den noch vorhandenen Substanzen die Gruppe der Lecithine zu isolieren. Lecithin gibt bekanntlich mit ammoniakalischem Bleiacetat keine Fällung, dagegen fällt es mit Chlorcadmium.

Fällung mit ammoniakalischem Bleiacetat. Die nach Entfernung der Hauptmenge des Kephalins zurückbleibende alkoholische Lösung wurde zunächst mit einer frisch bereiteten Lösung von alkoholischem ammoniakalischem Bleiacetat versetzt, bis keine Füllung mehr erfolgte. Es bildete sich ein ziemlich reichlicher, weißer, flockiger Niederschlag. Dieser wurde auf dem Filter gesammelt, mit absolutem Alkohol gewaschen

und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Er gab einen leicht gelb gefärbten, harten, glasigen Körper, der sich zu einem sehr hygroskopischen Pulver verreiben ließ. An der Luft backte er zusammen und wurde dunkler. Er war in Äther zum größten Teil löslich und fiel auf Zusatz von Alkohol wieder in weißen Flocken aus, war löslich in kaltem Benzol, unlöslich in heißem Alkohol. In heißem Essigäther gelöst, fiel er beim Erkalten wieder aus. Das durch Lösen in Äther und Fällen mit Alkohol gereinigte Präparat hatte einen Schmelzpunkt von 174°. Es lag hier ein der Gruppe der Kephaline angehörender Körper vor.

Chlorcadmiumfällung. In dem klaren Filtrat wurde das überschüssige Blei durch Schwefelwasserstoff und dieser durch einen Luftstrom entfernt. Das Filtrat wurde im Vakuum etwas eingeengt und mit kalt gesättigter absolut-alkoholischer Chlorcadmiumlösung versetzt. Es fiel ein weißer, dichter, flockiger Niederschlag, der im Exsiccator zu einem weißen, etwas klebrigen Pulver wurde. Dieses war nur zum Teil löslich in kaltem Benzol und fiel daraus bei Zusatz von Alkohol; erhitzt löste sich jedoch nur wenig vom Niederschlag. In warmem Äther ging ein Teil des Pulvers in Lösung.

Diese eigentümlichen Lösungsverhältnisse zeigten, daß es sich hier nicht bloß um ein Chlorcadmiumdoppelsalz der Lecithine handeln könne.

Lecithinchlorcadmium ist unlöslich in Äther. Zur Gewinnung der Lecithinverbindung wurde daher der ganze Chlorcadmiumniederschlag zunächst mit heißem Äther behandelt. Es ging etwas gelb gefärbte Substanz in Lösung. Diese wurde von dem unlöslichen Rückstand durch Zentrifugieren getrennt und der Äther im Vakuum abdestilliert. Über Schwefelsäure getrocknet bildete er einen wachsartigen, etwas klebenden, gelb gefärbten Körper. Schmelzpunkt 176°. Der in Äther unlösliche Rückstand wurde mit Äther gewaschen und in Benzol zu lösen versucht. Er löste sich nicht vollständig; auch nach dem Erwärmen blieb ein in heißem Benzol unlöslicher Teil zurück. Dieser wurde heiß abfiltriert. Die Masse auf dem Filter war gallertig, trocknete wachsartig ein und gab ein weißes Pulver. In dem heißen, klaren Filtrat trat beim Erkalten eine opalisierende Trübung auf. Nach längerem Stehen setzte sich

am Boden des Gefäßes ein feiner Belag ab. Die darüber stehende klare Flüssigkeit wurde abgegossen, eingeengt und mit absolutem Alkohol gefüllt. Es entstand ein flockiger Niederschlag, der sich beim Erwärmen löste und beim Erkalten wieder ausfiel. Erst dieser Niederschlag konnte auf Grund seiner Lösungsverhältnisse als Lecithinchlorcadmiumverbindung angesprochen werden.

Wie aus der Schilderung der Methodik hervorgeht, handelte es sich bei diesem Trennungsverfahren hauptsächlich um die Isolierung bestimmter aus dem Gehirn bekannt gewordener Substanzgruppen. Innerhalb dieser Gruppen wieder sind, ebenfalls aus Gehirnmaterial, einzelne Körper näher untersucht und als chemische Individuen beschrieben worden. So ist aus der Gruppe der Cerebroside von früher her das Cerebrin, das Kerasin, das Phrenosin und in neuerer Zeit das Cerebron bekannt geworden, deren Beziehung zueinander noch nicht feststeht. Soweit es möglich war, wurde eine Identifizierung der Nervenprodukte mit solchen Körpern versucht, was bei dem von Thierfelder gut charakterisierten Cerebron noch am besten gelingt. Ebenso wurde die Gruppe der Kephalinsubstanzen genauer untersucht und mit der entsprechenden Gruppe aus dem Gehirn in Vergleich gebracht.

Eine eingehendere Prüfung und Charakterisierung der dem Lecithin entsprechenden Fraktion konnte nicht vorgenommen werden, weil die Ausbeute aus den peripheren Nerven zu gering war.

Charakterisierung der erhaltenen Substanzen.

Der Acetonextrakt besteht in seinem Hauptanteil aus Cholesterin. Dieses, entsprechend gereinigt und aus wasserhaltigem Alkohol umkrystallisiert, bildet schöne große rhombische Tafeln, gibt die Salkowskische und Liebermannsche Reaktion und hat den richtigen Schmelzpunkt von 145°.

Die nach der Ätherbehandlung ausgefällten Roh-Cerebroside enthalten noch Phosphor. Die Befreiung von den phosphorhaltigen Verunreinigungen ist umständlich und führt erst mit Hilfe von eigenen Verfahren und nach oftmaligem Umkrystallisieren zum Ziel. Vor der Reinigung besaß das Gemenge einen Schmelzpunkt von 204°; gab die Oleo-Cholid-Reaktion

und Reduktion nach Spaltung. In heißem Äther war die Substanz unlöslich, aus heißem Alkohol fiel sie beim Erkalten aus. In Wasser gebracht, quoll sie kaum. Die Roh-Cerebroside wurden nach Thierfelder aus heißem, 20% Chloroform enthaltenden Methylalkohol umkrystallisiert. Beim Erkalten fiel ein schneeweißer Körper in zusammenhängenden kugeligen Gebilden aus. Schmelzpunkt 209°. Es unterliegt keinem Zweifel, daß es sich hier um das von Thierfelder aus dem Gehirn dargestellte und ausführlich beschriebene Cerebron handelt. Dieser Körper scheint den überwiegenden Anteil der Cerebroside der markhaltigen Nerven auszumachen.

Kephaline. Wie bereits erwähnt, wird durch Fällen aus ätherischer Lösung mit Alkohol eine Phosphatid-Gruppe gewonnen, die sich durch diese Darstellungsweise schon sehr wesentlich von der Reihe phosphorhaltiger Körper, die dem Lecithin verwandt sind, unterscheidet, und die von Thudichum den Namen der Kephaline erhalten hat. Diese Körper wurden von mir aus Menschengehirn isoliert näher untersucht, und es soll darüber an anderer Stelle berichtet werden.

Das Kephalin[1]) ist, soweit ich die Literatur überblicke, aus peripheren Nerven noch nicht dargestellt. Die Reinigung der Rohsubstanz geschah in der Weise, daß sie mit abs. Alkohol ausgekocht, der Rückstand in Äther aufgenommen und mit Alkohol gefällt, und dieses Verfahren wiederholt wurde. Das etwas gelb gefärbte kreidige Pulver entsprach in seinen Haupteigenschaften dem Gehirnkephalin. Schmelzpunkt 174°.

Bemerkenswert sind die Analysenwerte für Stickstoff und Phosphor sowie das Verhältnis dieser beiden zueinander.

0,2812 g Substanz gaben 1,917% N
0,2882 g „ „ 1,967% N } Durchschnitt 1,94% N.

0,1263 g Substanz gaben 4,41% P
0,1292 g „ „ 4,42% P.

Bringt man den Phosphorgehalt mit 4,42% in Rechnung, so berechnet sich das Atomverhältnis von

P:N zu 1:0,98 also sehr nahe 1:1.

Danach ist das Nervenkephalin ein Monoaminomonophosphatid. Dieses Verhältnis ist sowohl von Thudichum als

[1]) Der Einfachheit halber wird im Folgenden von dem Kephalin gesprochen, womit die ganze Gruppe gemeint sei.

auch von Koch und Cousin für das von ihnen gefundene Gehirnkephalin angegeben worden. Trotzdem kann gegenwärtig die Identität mit Gehirnkephalin nicht oder nur mit entsprechendem Vorbehalt angenommen werden. Denn abgesehen davon, daß, wie die vergleichende Tabelle lehrt, die Stickstoff- und Phosphorwerte, bei gleichem Atomverhältnis, nicht unerheblich verschoben sind, stimmen auch die Kohlenstoffzahlen nicht überein. Es soll hier nicht unerwähnt bleiben, daß die von Thudichum, Koch und Cousin angewandten Darstellungsmethoden von der hier durchgeführten verschieden sind, und daß ich nach diesem Verfahren aus dem Gehirn Kephalinpräparate erhalten habe, deren P:N-Verhältnis dem von 1:2 entsprach.

Autor	%P	%N	P:N	Material
Thudichum . .	4,27	1,68	1:1	Gehirn
Koch	3,85	1,75	1:1	"
Cousin	3,73—3,89	1,82—1,86	1:1	"
Falk	4,42	1,94	1:1	Nerven
"	3,28	2,91	1:2	Gehirn
"	3,16	2,76	1:2	"

Von dem Nervenkephalin gaben:

0,1134 g Substanz 0,2318 g CO_2 oder 55,75% C

und 0,0979 g H_2O „ 9,66% H.

Dagegen fanden in dem Gehirnkephalin

Thudichum: 60,00% C und 9,38% H,

Koch: 59,5 % C „ 9,8 % H,

Ich selbst: {56,74% C „ 9,03% H,
{57,56% C „ 9,21% H.

Es ist wenig wahrscheinlich, daß dem Nervenkephalin anhaftende Verunreinigungen mit Substanzen anderer Gruppen diese differenten Analysenresultate bedingt haben, was bei der Möglichkeit einer für analytische Zwecke nur mangelhaften Reinigung natürlich nicht auszuschließen ist. Mit Rücksicht auf den niederen Kohlenstoffgehalt könnte man beispielsweise an Beimengungen von Cerebrosiden denken. Aber abgesehen von dem Fehlen jeder die letzteren charakterisierenden Reaktionen, erscheint diese Annahme mit dem hohen Phosphorgehalt nicht vereinbar. Man wird daher in Anbetracht der verhältnismäßig geringen Kenntnisse, die man von dieser schwierigen

Körpergruppe besitzt, sich vorläufig dahin äußern müssen, daß auf Grund der Übereinstimmung und der Eigenschaften mit den aus dem Gehirn isolierten Substanzen das Nervenkephalin in die Gruppe der Kephaline einzureihen ist, daß aber die teilweise Verschiedenheit in der Zusammensetzung auf die Existenz mehrerer dieser Gruppe angehörenden chemischen Individuen hinzudeuten scheint.

Alkoholische Lösung. Aus dieser Fraktion wurde, wie erwähnt, eine Blei- und eine Chlorcadmiumverbindung gewonnen, die in Äther löslich waren und mit Alkohol ausfielen. Die Schmelzpunkte beider Verbindungen waren ungefähr die des Kephalins. Nach den für das Kephalin und seine Metallverbindung eigentümlichen Löslichkeitsverhältnissen und Schmelzpunktsgrenzen, sowie aus den bei der Behandlung auftretenden, das Kephalin kennzeichnenden Merkmalen kann geschlossen werden, daß durch die Blei- resp. Chlorcadmiumfällung der Kephalingruppe angehörige Substanzen zur Ausscheidung gelangten, die der Fällung mit Alkohol resp. mit Blei entgangen waren. Die Möglichkeit dieser Erscheinung hat Thudichum bei der Bearbeitung der entsprechenden Gehirnfraktionen ebenfalls beobachtet. Analytische Belege für diesen Schluß fehlen noch.

Die als Lecithinsalz anzusprechende Verbindung beschränkte sich auf jene Portion der Chlorcadmiumfällung, die in kaltem Benzol löslich war und mit Alkohol niedergeschlagen werden konnte. Ihre Menge war überraschend gering. Namentlich mußte das Mißverhältnis im Gegensatz zu den beträchtlichen Kephalinmengen auffallen. Dieser Befund steht in offenem Widerspruch mit den landläufigen Anschauungen über den Lecithingehalt der peripheren Nerven. Danach wird bei diesen nur von einem Phosphatid gesprochen, und zwar von Lecithin. Es wird Aufgabe des zweiten Teiles dieser Untersuchungen sein, eine genauere Vorstellung über die Mengenverhältnisse der Phosphatide zu geben. Es sei hier noch erwähnt, daß die oben durchgeführte qualitative Prüfung die Vermutung nahelegt, daß neben dem Kephalin und dem Lecithin sich noch andere Repräsentanten der phosphorhaltigen Körper finden, die allerdings bisher nicht näher bekannt sind. Es wird notwendig sein, erst an dem reichlicher zu erhaltenden Gehirnmaterial zu einer Charakterisierung dieser Stoffe zu gelangen.

Die Resultate der qualitativen Untersuchung der N. ischiadicus vom Menschen zusammenfassend, läßt sich sagen, daß zum Teil als sichergestellt. zum Teil als höchst wahrscheinlich angenommen werden muß, die Anwesenheit von Cholesterin, von Cerebron, von Kephalin, von Lecithin, sowie von einer Reihe nicht näher definierbarer Cerebroside und Phosphatide. Das Cholesterin ist nach Schmelzpunkt und Reaktionen mit dem an anderen Orten vorgefundenen identisch. Für den Beweis der Identität des Nervencerebrons mit dem Gehirncerebrons fehlen vorläufig die analytischen Belege und die Hydrolyse, sie muß aber von vornherein als sehr wahrscheinlich bezeichnet werden. Daß das Nervenkephalin mit dem Kephalin des Gehirns nicht ohne weiteres als gleich anzunehmen ist, wurde bereits dargelegt. Für die entsprechende Beweisführung am Lecithin wurden nicht genügende Mengen erhalten.

III.

Quantitative Untersuchung der marklosen und markhaltigen Nerven.

Wurde im vorausgehenden Abschnitt eine Reihe der besser gekannten „Lipoid"stoffe im peripheren Nerven nachgewiesen, so sollen hier Bestimmungen über ihre Mengenverhältnisse Platz finden. Die vergleichende Ermittelung der quantitativen Resultate an marklosen und markhaltigen Fasern sollte außerdem lehren, ob es möglich ist, auf diesem Wege zu einer präziseren Anschauung über die nähere Verteilung der gefundenen Stoffe in dem anatomischen Substrat des Nerven zu gelangen. Es war von vornherein nicht ausgeschlossen, daß sich auf Grund der Befunde an geeignetem marklosem Material Anhaltspunkte für die Beurteilung der physiologischen Dignität der in Betracht kommenden chemischen Bestandteile finden lassen, oder daß zum mindesten eine Grundlage geschaffen wird, von der aus die Frage nach der stofflichen Natur der reizleitenden Nervenelemente in zielbewußter Weise in Angriff genommen werden könnte.

Mit ähnlicher Absicht ging man früher an die vergleichende Untersuchung der grauen und weißen Substanz des Gehirns. Die älteren einschlägigen Arbeiten, so die von Bibra und die

von Baumstark, begnügten sich mit vergleichenden Bestimmungen des Wassergehaltes, des Ätherextrakts, des Alkoholextrakts und des festen Rückstandes.

Petrowsky erweiterte die quantitativen Untersuchungen auf spezielle damals bekannte Produkte. In seiner Tabelle finden sich die entsprechenden Zahlen für Lecithin, Cholesterin + Fetten und Cerebrin. Seine Darstellungsmethode entsprach ungefähr der von Chevalier angewendeten. Es handelt sich auch bei Petrowsky nicht um direkt gefundene, sondern berechnete Werte. Voraussetzung für die Richtigkeit der Rechnung ist, daß neben Cholesterin, Lecithin, Cerebrin keine anderen äther- oder alkohollöslichen Bestandteile im Gehirn vorkommen. Daher können seine Angaben kaum verwendet werden. Ähnlich verhält es sich mit der Bestimmung der Protagonmenge in weißer und in der Rindensubstanz von Noll.

Dagegen finden sich in der tabellarischen Zusammenstellung von Thudichum verwendbare Daten, die später herangezogen werden.

Bei dem komplizierten Bau des Gehirns kann die vergleichende Untersuchung der grauen und der weißen Substenz nur wenig sichere Aufschlüsse über den Unterschied in der Zusammensetzung des sog. Nervenmarks und der markfreien Faser geben. Diesem Material gegenüber bietet die Verwendung von marklosen und markhaltigen peripheren Nerven große Vorzüge.

Die im folgenden aufgenommene Methode der Gewichtsbestimmung der einzelnen Substanzen konnte nur eine präparative sein. Die isolierten Körper kamen entweder als solche oder als Blei- resp. Chlorcadmiumverbindung zur Wägung.

A. Marklose Fasern.

Als Material für histologische Zwecke wurden bisher marklose Fasern verschiedener Provenienz zur Verwendung empfohlen. So der N. olfactorius vom Hecht, der Milznerv vom Rind, der Ramus cardiacus vom Ganglion stellatum des Hundes, des Sympathicus des Kaninchens. Für chemische Zwecke kommt vor allem die Zugänglichkeit größerer Materialmengen in Frage. Der Riechnerv des Hechtes ist, wie Boveri zeigte, leider kein markloser Nerv. Ich habe den Riechnerv

und den Bulbus olfact. eines dem Hecht verwandten Teleostiers histologisch nach Weigert auf Markscheiden untersucht und kann bestätigen, daß der Nerv in seinem Verlauf markhaltige Fasern führt. Der Bulbus selbst entspricht zwar grauer Substanz, enthält aber noch in seinem Innnern ein Bündel markhaltiger Fasern. Dagegen entsprechen die Milznerven vom Rind den gewünschten Anforderungen. In ihrem Querschnitt sieht man nur ganz vereinzelt Markfasern.

Verarbeitung. Der Nerv wurde sorgsam aus dem Milzhilus und dem Milzgewebe herauspräpariert, von der äußeren Bindegewebsscheide mit daran haftenden Fetttröpfchen befreit, auf einer Glasplatte im Brutofen getrocknet und dann zerkleinert. Es wurden auf diesem zeitraubenden Wege 4,43 g Trockensubstanz gewonnen.

Die Weiterbehandlung und die systematische Extraktion und Fraktionierung erfolgte in derselben Weise, wie für die qualitative Untersuchung angegeben worden ist. Nur fällt hier die vorgängige Petrolätherbehandlung fort.

Die Trockensubstanz wurde also mit heißem Benzol dreimal gründlich ausgekocht — die letzte Benzolmenge blieb farblos — und kalt filtriert. Der Rückstand wog getrocknet 3,92 g. Es wurden an sog. Lipoidsubstanzen 0,51 g oder 11,51 % extrahiert. Nach dem Einengen der Lösung im Vakuum erhält man eine rotbraune Flüssigkeit mit grüner Fluorescenz, ähnlich der einer Benzollösung von Kephalin. Das Benzol wird vollkommen entfernt. Es blieb eine braune harzige Masse zurück.

Diese wurde mit heißem Aceton ausgezogen. Dabei ging Cholesterin und daneben eine gelb gefärbte Substanz in Lösung. Der in Aceton unlösliche Rückstand blieb in harziger Form an den Glaswänden haften. Es wurde heiß in eine gewogene Glasschale filtriert und mit heißem Aceton nachgewaschen. Acetonextrakt = 0,2941 g.

Mit diesem Extrakt bekommt man keine Oleo-cholid-Reaktion, ebensowenig eine Reduktionsprobe noch Spaltung. Demnach sind keine Cerebroside mit extrahiert worden, Die Fällung mit ammoniakalischem Bleiacetat gibt einen in Äther löslichen und daraus mit Alkohol fällbaren Niederschlag, mit Chlorcadmium dagegen keinen. Die in Lösung mitgegangene Substanz scheint also zu den Kephalinen zu gehören. Das Cholesterin, gereinigt, krystallisiert in weißen Täfelchen. Schmelzpunkt 144°. Reaktion von Liebermann und Salkowski positiv. Auf Cholesterin entfallen ca. 47 %.

Der in Aceton unlösliche harzige Rückstand löst sich vollständig in Äther. Durch wiederholtes Fällen mit Alkohol erhält man an Kephalinen 0,0380 g oder 7,45 %. Diese ungereinigte phosphorhaltige Substanz hat einen Schmelzpunkt von 180°. Nach der Entfernuug dieser

Kephaline und neuerlichem Aufnehmen mit Äther, fiel beim Abkühlen bis zur Temperatur des schmelzenden Eises ein feiner weißer Niederschlag, der sich später auch im frischen Äther nicht mehr löste. Mit Äther gründlich erschöpft, betrug die Menge der Cerebroside 0,0309 g oder 6,05 %. Der Schmelzpunkt der ungereinigten Substanz war 190°, Oleocholid-Reaktion und Reduktionsprobe positiv.

Hat man die Cerebroside weggebracht, so behält man eine alkoholische Lösung. Es wird nun ein aliquoter Teil dieser Lösung eingedampft und ihr Rückstand zu einer Phosphorbestimmung verwendet:

10 ccm = 0,0992 g Rückstand = 3,36 % P.

Diese hohe Phosphorzahl, die der Durchschnittszahl für den Phosphorgehalt der Phosphatide aus der Nervensubstanz ungefähr entspricht, zeigt an, daß die alkoholische Lösung kaum andere Körper als Phosphatide enthält. Es wurde infolgedessen die Fällung mit den Metallsalzen vorgenommen. Aus dem Rest (12,5 ccm) der Lösung konnte durch das Bleireagens eine Bleiverbindung gefällt werden, deren Menge 0,1125 g betrug. Von dieser wurden als Bleikephalin gewonnen: 0,0548 g.

Die Chlorcadmiumfällung gibt nach Abzug einer ganz geringen Menge eines ätherlöslichen Salzes 0,0342 g Chlorcadmiumlecithin. Dieses war in kaltem Benzol glatt löslich und fiel durch Alkohol wieder aus. Nach den Metallsalzfällungen blieb noch eine geringe Menge einer Substanz zurück, die, weil nicht definierbar, nicht weiter verwertet wurde. Addiert man zu den für 12,5 ccm der Lösung gefundenen Mengen der Phosphatidsalze noch die für die weggenommenen 10 ccm berechneten Mengen, so ergibt sich für das Kephalinblei eine Ausbeute von 0,0986 g, für das Chlorcadmiumlecithin von 0,0615 g.

Für das Kephalinblei hat Thudichum einen Bleigehalt von 16 % gefunden. Das für Blei berechnete Gewicht in Abzug gebracht, bleiben für Kephalin 0,0828 g oder 16,24 %.

Das Cadmiumlecithin ist, wie schon Strecker und Bergell beobachtet haben, inkonstant zusammengesetzt. Bergell gibt für das Eilecithin als Durchschnittsgehalt an Cadmium 12,399 % an oder 20,22 % $CdCl_2$.

Thudichum findet in dem Chlorkadmiumlecithin des Ochsenhirns 19,1 % $CdCl_2$. Legt man diesen Wert der Berechnung des Lecithins zugrunde, so ergibt sich in unserm Fall 0,0492 g oder 9,76 % lecithinartige Substanz.

B. Markhaltige Fasern.

Das hier verwendete Material wurde aus menschlichen Ischiadicis, und zwar in der Weise gewonnen, daß aus möglichst fettarmen Nervenstämmen die Nervenfasern einzeln ausgezupft wurden. Man erhält so fett- und bindegewebsfreie Fasern. Eine Vorbehandlung mit Petroläther wurde so ver-

mieden. Das Material wurde wie die marklosen Fasern weiterbehandelt.

Die Untersuchung der markhaltigen zeigte gegenüber denjenigen der marklosen Fasern in allen ihren Phasen so augenfällige Verschiedenheiten, daß man schon daraus erkennen konnte, daß hier andere Substanzen vorherrschend sind wie dort. Man konnte sich andererseits davon überzeugen, wie sehr die Löslichkeitsverhältnisse von Gemengen sich bei gleichen Lösungsgenossen aber verschiedener, absoluter und relativer Mengenverteilung derselben ändern. Entsprechend diesen geänderten Löslichkeitsbedingungen mußte auch der Gang der Fraktionierung stellenweise etwas abgeändert werden. Es soll daher im folgenden auf diese Verschiedenheiten besonders hingewiesen werden.

Von 3,7731 g Trockenfasern blieben nach der Benzolextraktion 2,0152 g zurück. Es wurde somit 1,7579 g oder 46,59 % Substanz extrahiert.

Der Benzolextrakt ist trotz starker Konzentration nur wenig gelb gefärbt und zeigt keine Fluorescenz. Nach Vertreiben des Benzols bleibt eine fast weiße, feste, in dünnen Blättern sich abbröckelnde Substanz zurück.

Der Acetonextrakt ist fast farblos, sein Rückstand beträgt 0,4642 g oder 26,41 %. Schon aus dem Acetonextrakt krystallisieren die ersten Portionen des Cholesterins farblos und mit dem Schmelzpunkt von 142° aus. Salkowskis und Liebermanns Reaktionen sind positiv. Verdampft man das Aceton und nimmt mit Äther auf, so bleibt ein Teil unlöslich zurück = 0,0191 g oder 1,08 %. Es handelt sich um Cerebroside.

Versetzt man den in Aceton unlöslichen Rückstand mit Äther, so bleibt hier ein großer Teil als weißer, körniger Niederschlag zurück. Der Niederschlag ist gröber als sonst, wenn eine größere Menge Phosphatide in Lösung sich befindet. Er läßt sich abfiltrieren und wird mit Äther ausgewaschen. Die Ausbeute an Cerebrosiden beträgt 0,2156 g oder 12,26 %. Dieses Gemenge schmilzt ungereinigt bei 204° und gibt die für diese Gruppe charakteristischen Reaktionen. Durch Alkoholfällung aus der ätherischen Lösung wurde ein fast weißes, kreidiges Kephalin-Präparat erhalten. Ausbeute: 0,1931 g oder 10,98 %. Schmelzpunkt der ungereinigten Substanz: 172 bis 174°.

Durch öftere Wiederholung der entsprechenden Manipulationen wurden noch gewonnen an Cerebrosiden 0,0853 g oder 4,85 %, an Kephalinen 0,0249 g oder 1,42 %.

Schließlich wurden für die Fraktionierung durch die Metallsalze 43,5 ccm einer alkalischen Lösung erhalten. Von diesen werden 15 ccm für die Phosphorbestimmung verwendet. Diese geben einen Rückstand von 0,1137 g mit 2,98 % Phosphor. Auch hier zeigt der hohe Phosphor-

gehalt die Anwesenheit von Phosphatiden in überwiegender Mehrheit an. Die Bleifällung gab in der restierenden Lösung einen Niederschlag entsprechend 0,0627 g. Dieses Bleisalz ist in Äther und in Alkohol kalt und heiß nicht löslich, löst sich aber in kaltem Benzol und fällt mit Alkohol. Mit welcher Bleiverbindung man es hier zu tun hat, bleibt gegenwärtig noch dunkel. Der Chlorcadmium-Niederschlag beträgt in Benzol gelöst und mit Alkohol gefällt 0,0497 g. Berechnet für die gesamte alkoholische Lösung ergibt sich 0,0672 g Chlorcadmium-Lecithin oder 0,051 03 g = 2,9 % Lecithin.

Nachstehend stelle ich die gefundenen Werte tabellarisch zusammen.

Marklose F. Gesamtextraktmenge = 11,51 %				Markhaltige F. Gesamtextraktmenge = 46,59 %			
Substanzen	in Prozenten des Gesamtextrakts: direkt gewonnen	in Prozenten des Gesamtextrakts: aus Blei- resp. Chlorcadmiumverbindung berechnet	Summe %	Substanzen	in Prozenten des Gesamtextrakts: direkt gewonnen	in Prozenten des Gesamtextrakts: aus Blei- resp. Chlorcadmiumverbindung berechnet	Summe %
Cholesterin	47,0	—	47,0	Cholesterin	25,0	—	25,0
Kephaline	7,5	16,2	23,7	Kephaline	12,4	—	12,4
Cerebroside	6,0	—	6,0	Cerebroside	18,2	—	18,2
Lecithine	—	9,8	9,8	Lecithine	—	2,9	2,9
		Summe	86,5			Summe	58,5

Tabelle

zum Vergleich mit Bestimmungen aus grauer und weißer Substanz des Gehirns.

	Graue Substanz	Weiße Substanz
	100 g feuchte Substanz geben:	
Thudichum:		
Cholesterin	1,96 g	3,26 g
Kephalin	0,33 „	0,09 „
Phrenosin	—	—
Lecithin	1,59 „	0,73 „
	100 g Trockensubstanz geben:	
Petrowsky:		
Cholesterin + Fette	18,68 g	51,90 g
Cerebrin	0,53 „	9,54 „
Lecithin	17,24 „	9,90 „

Die Tabelle läßt eine Reihe interessanter Tatsachen erkennen. Zunächst findet man, daß die beiden Nervenarten in

qualitativer Beziehung mit Rücksicht auf die besser charakterisierten Stoffe nicht verschieden sind. Dagegen begegnete die Untersuchung der markhaltigen Fasern Substanzen, die, weil noch unerforscht, in die Tabelle nicht aufgenommen wurden und die Differenz in der Ausbeute ausmachen.

In quantitativer Beziehung bestätigt sich die Beobachtung, die schon bei der Darstellung gemacht worden war. In den marklosen Fasern sind die Phosphatide sehr reichlich vertreten, in den Markfasern überwiegen die Cerebroside. Es zeigt sich in beiden Fällen, daß nicht Lecithin, sondern Kephalin das Hauptphosphatid, der für die Nervenfaser charakteristische phosphorhaltige Körper ist.

Überraschend war auch der hohe Cholesteringehalt der marklosen Fasern.

Ein Vergleich dieser Resultate mit den vorliegenden Bestimmungen aus grauer und weißer Substanz kann direkt nicht gemacht werden. Thudichums Zahlen beziehen sich auf feuchte Substanz, und jene Petrowskys sind nicht einwandfrei. Es können die einzelnen Werte nur untereinander verglichen werden.

Der größere Phosphorgehalt der grauen Substanz und der größere Gehalt von Cerebrosiden für die weiße Substanz stimmt zu den Mengenverhältnissen der marklosen resp. markhaltigen Fasern.

Die Werte für das Cholesterin verhalten sich dagegen beim Gehirn umgekehrt wie bei den peripheren Nerven.

„Markhaltig" und „marklos" sind anatomische Begriffe. Auch die Marksubstanz oder das „Myelin" nach Virchow ist eine morphotische Bezeichnung. Chemisch ist sie der Ausdruck für einen Komplex von mehr oder weniger gut definierten Substanzen. Wie viele und welche chemische Substanzen in diesen anatomischen Begriff einzuordnen sind, darüber lassen sich genaue Angaben nicht machen. Auch der Versuch, aus der Differenz zwischen den „Lipoidstoffen" der markhaltigen und marklosen Fasern einen Schluß zu ziehen, kann nur als Notbehelf angesehen werden.

Die marklose Faser setzt sich bekanntlich anatomisch zusammen — wenn man von den protoplasmatischen Bestandteilen absieht — aus der Bindegewebs-, der sog. Schwann-

schen Scheide, aus den Primitivfibrillen und aus der die letztern miteinander verkittendenden interfibrillären Substanz. Eine eigene Myelinschicht findet sich hier nicht. Dagegen ist beachtenswerterweise von neueren Nervenhistologen auf das Vorkommen von „Myelin“ in der interfibrillären Substanz aufmerksam gemacht worden. In der Tat hat obige chemische Untersuchung gezeigt, daß mit Bezug auf die bisher beobachtete „Lipoidstoffe“ kein solcher prinzipieller Unterschied zwischen marklosen und markhaltigen Fasern besteht, wie nach dem mikroskopischen Bilde zu erwarten war.

Literatur.

1. Baumstark, Zeitschr. f. physiol. Chem. **9**, 1885.
2. Bergell, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **33**, 1900.
3. Bibra, „Vergleichende Untersuchungen über das Gehirn der Menschen und der Wirbeltiere“, Mannheim 1859.
4. Boveri, Abhandl. d. math. phys. Klasse d. k. bayr. Akademie d. Wissenschaften **15**, 1885.
5. Chevalier, Zeitschr. f. physikal. Chem. **10**, 1886.
6. Cousin, Compt. rend. **61**, 1906.
7. „ Journ. de Pharm. et de Chem. **24**, 1906.
8. Ellermann, Skand. Arch. f. Physiol. **14**, 1903.
9. Gast und Heymanns, Du Bois-Reymond Arch. **1890**.
10. Halliburton, Ergebnisse d. Phys. Biochem. Abt. 4.
11. Koch, Zeitschr. f. physiol. Chem. **30**.
12. Noll, Zeitschr. f. physiol. Chem. **27**.
13. Petrowsky, Pflügers Archiv **7**, 1873.
14. Thierfelder, Zeitschr. f. physiol. Chem. **30**.
15. Thudichum, „Chem. Konstitution d. Gehirns des Menschen“, Tübingen 1901.
16. Wlassak, Arch. f. Entwicklungsmechanik d. Org. **6**.

Über die Änderung der inneren Reibung beim Abbau von Eiweiß.

(Vorläufige Mitteilung.)

Von

Karl Schorr.

(Aus der Biologischen Versuchsanstalt in Wien.
Physikalisch-chemische Abteilung.)

(Eingegangen am 10. August 1908.)

Mit 2 Figuren im Text.

Vor einigen Jahren hat E. J. Spriggs[1]) konstatiert, daß bei der Einwirkung von Pepsinsalzsäure auf Eiweiß (aus Rindfleisch extrahiertes Syntonin) eine Abnahme in der Viscosität der Lösung zu beobachten ist. Diese Abnahme, die, wie aus der Bestimmung des Verhältnisses des koagulablen zum unkoagulablen Anteile hervorgeht, der fortschreitenden Verdauung entspricht, findet demgemäß sowohl bei der Einwirkung von bloßer Salzsäure als auch beim Einhalten einer niedrigeren Temperatur des Verdauungsgemisches (5°) langsamer statt.

Bei Versuchen, die ich von anderen Gesichtspunkten aus an salzfrei dialysierter, mit verschieden starker Natronlauge versetzter Serumlösung vornahm, ergab sich folgendes bemerkenswertes Verhalten.

Beim Beginne der Laugeneinwirkung zeigt sich zunächst eine deutliche Zunahme der inneren Reibung, die erst nach Erreichung eines gewissen Maximums in eine stetige Abnahme der Reibungswerte übergeht. Je nach der Stärke der verwendeten Lauge und der Höhe der Versuchstemperatur variiert im Kurvenbilde die Steilheit und Länge des Reibungsanstieges und die Dauer des Verweilens auf der Höhe des Maximums vor dem Abfalle der Reibungswerte.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chemie 35, 465, 1902.

Als Beispiel diene eine an 0,25 fach normaler Natronlaugen-Serumlösung bei 24,5° C gewonnene Reihe, die ich in ihren Zahlenwerten und im Kurvenbilde wiedergebe.

Die Bestimmungen wurden in der üblichen Weise mit einem Viscosimeter in der von Ostwald angegebenen Form in einem Thermostaten ausgeführt, dessen Temperaturschwankungen 0,02° nicht überschritten. Wo die Ablesungen (wie in den meisten Fällen) durch längere Zeit hindurch ausgedehnt wurden, wurden die Lösungen durch tiefes Eintauchen des Viscosimeters in die Badeflüssigkeit und gutes Verkorken während der notwendigen Zwischenpausen möglichst vor Verdunstung und chemischer Veränderung (hauptsächlich durch die Kohlensäure der Luft) geschützt. Zur Bestimmung der Durchlaufszeit diente eine Rennuhr, die Fünftelsekunden anzeigte.

Tabelle I.

0,25 n NaOH-Serum bei 24,5° C.

An Stelle der eigentlichen Reibungswerte sind hier, wie unten in Tabelle II, der Einfachheit halber die ihnen — unter Voraussetzung gleich bleibenden spezifischen Gewichtes[1]) — proportionalen Durchströmungszeiten gesetzt. Unter a steht die vom Augenblicke des Laugenzusatzes an verflossene Zeit in Minuten, unter b die Durchströmungszeit in Fünftelsekunden.

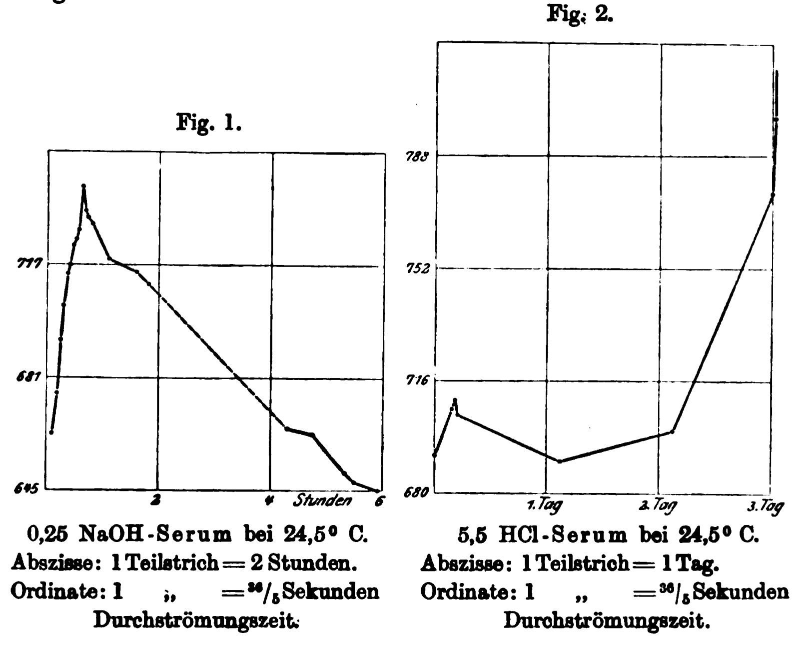
a Min.	b	a Min.	b	a Min.	b	a Min.	b
8	663	34	728	66	721	261	665
12	676	37	742	70	722	285	663
15	693	41	734	96	715	320	651
18	704	44	732	102	712	324	651
22	714	48	730	105	710	330	648
25	717	55	730	109	711	347	647
28	723	58	729	253	669	355	645
31	725	62	729	258	665		

Anschaulicher werden diese Verhältnisse, wenn wir die hier enthaltenen Beobachtungen zu einem Kurvenbilde zusammenfügen, dessen Abszissenwerte den zeitlichen Verlauf des

[1]) Wie weiter unten auseinandergesetzt wird, ist diese Annahme wahrscheinlich nicht strenge gültig, ohne daß aber die hierdurch entstandenen Fehler die in der Methode begründete Fehlergrenze überschreiten könnten.

Prozesses illustrieren, während als Ordinaten die Durchströmungszeiten aufgetragen sind. (Siehe Figur 1.)

Auch bei mit Salzsäure versetztem Serum, das sonst die gleiche Behandlung erfuhr wie im ersten Falle, ließ sich ein ebensolcher anfänglicher Anstieg der inneren Reibung mit nachfolgendem Abfalle nachweisen.



0,25 NaOH-Serum bei 24,5° C.
Abszisse: 1 Teilstrich = 2 Stunden.
Ordinate: 1 „ = 36/5 Sekunden Durchströmungszeit.

5,5 HCl-Serum bei 24,5° C.
Abszisse: 1 Teilstrich = 1 Tag.
Ordinate: 1 „ = 36/5 Sekunden Durchströmungszeit.

In dem Beispiele, das ich hier zur Exemplifizierung herausgreifen will, zeigt sich gleichzeitig noch eine weitere interessante Erscheinung.

Schon Spriggs[1]) hat (bei der Einwirkung von Pepsin auf Wittes Pepton) beobachtet, daß eine Lösung, in der sich eine zur Bildung eines Niederschlages führende Reaktion abspielt, noch lange vor dem Auftreten einer sichtbaren Trübung ein konstantes Ansteigen der inneren Reibung aufweist, bis die schließliche Ausfällung den Messungen begreiflicherweise ein Ende macht.

Diese Erscheinung kombiniert sich nun im vorliegenden Falle (5,5 fach normale Salzsäure-Serumlösung) mit den oben

---

[1]) l. c.

geschilderten in folgender Weise: Zuerst erfolgt eine Zunahme der Viscosität bis zu einem Maximalwert, worauf sofort der Abfall eintritt. Über diesen für die allgemeine Einwirkung von OH'- und H˙-Ionen auf Eiweißlösung offenbar typischen Verlauf lagert sich ein zweiter Prozeß, die Ausfällung der Serumlösung durch starke Säure, der jetzt erst einsetzt: Nach Passierung eines Minimums steigen also die Reibungswerte wieder an, schließlich rapide, bis die Flocken endlich die Reibungsröhre verstopfen. (Siehe Tabelle und Figur II.)

Tabelle II.

5,5 n HCl-Serum bei 24,5° C.

Unter a steht die von der ersten Messung an gezählte Zeit in Stunden, unter b die Durchströmungszeiten in Fünftelsekunden.

a Stunden	b	a Stunden	b
0	692	27	691
4	707	51	700
4,5	710	72	771
5	705	72,5	799

Zu diesen vorläufigen Mitteilungen sehe ich mich veranlaßt, da ich aus äußeren Gründen für die Dauer der Sommermonate verhindert bin, die begonnenen und großenteils nahe zu Ende geführten Untersuchungen über die Änderung der inneren Reibung von Eiweißlösungen bei wachsendem Alkali- und Säuregrade und verschiedener Temperatur und ihrer Beziehung zu sonstigen physikochemischen Konstanten, wie zum Beispiel der Leitfähigkeit und der Koagulationstemperatur, vor allem aber dem spezifischen Volum[1]) abzuschließen.

Die diesbezüglichen Ergebnisse, denen vielleicht auch einige Bedeutung für die Theorie des Eiweißabbaues zukommen dürfte, hoffe ich nach Ablauf der genannten Frist ausführlich vorlegen zu können.

[1]) Diese Änderung des spezifischen Volums hat eben zur Folge, daß, wie oben angedeutet, die Durchströmungszeiten den Reibungswerten nicht strenge proportional sind.

Über den Säuregrad des Harnes.

Von

Adolf Jolles.

(Aus dem chemisch-mikroskopischen Laboratorium von Dr. M. und Dr. Ad. Jolles in Wien.)

(Eingegangen am 17. August 1908.)

Mit 1 Figur im Text.

Die Titrationsmethoden zur Bestimmung des Säuregrades des Harnes geben uns zwar seine Gesamtacidität, ausgedrückt in Kubikzentimeter der verbrauchten Lauge, an, von dem Wesen des Säuregrades, der Konzentration der Wasserstoffionen erfahren wir dabei gar nichts. Es war also die Aufgabe der vorliegenden Arbeit, zu zeigen, wie groß die H-Konzentration des Harnes ist, und ob nur der Gehalt an sauren Phosphaten den Säuregrad des Harnes bedingt. Dies sollte vermittels der Wasserstoffionen-Konzentration auf physikalisch-chemischem Wege untersucht werden.

Theoretisch stehen mehrere Wege zur Bestimmung der Wasserstoffionen-Konzentration offen. — Die älteste und allbekannteste ist die Rohrzuckerinversion.[1]) Aus der Geschwindigkeit der Inversion schließt man auf die Konzentration der Wasserstoffionen, welche die Inversion tatsächlich verursacht.

Außerdem gibt uns die Beobachtung der Zerfallsgeschwindigkeit mancher organischer Verbindungen, wie Methylacetat,[2]) Acetamid[3]) oder Diazoessigester[4]) auch ein Mittel in die Hand, die Wasserstoffionen-Konzentration zu bestimmen. Sehr schöne

---

[1]) **Arrhenius**, Zeitschr. f. physikal. Chem. **4**, 226, 1889. — **Ostwald**, Journ. f. prakt. Chem. 29, 385, 1884; **31**, 307, 1885.

[2]) **Ostwald**, Journ. f. prakt. Chem. (**2**), 28, 449, 1883.

[3]) **Ostwald**, Journ. f. prakt. Chem. (2), **27**, **1**, 1883.

[4]) **Bredig-Fraenkel**, Zeitschr. f. Elektr. **11**, 525, 1905.

Resultate liefert die Methode der Gasketten, und besonders einfach ist die Methode der Indikatoren,[1]) die vor kurzem von Salm eingeführt worden sind.

Bei der Auswahl der verschiedenen Methoden erwies sich die Rohrzuckerinversionsmethode als die für den Harn entsprechendste. Die Methylacetat- und Diazoessigestermethode verlieren sehr an Sicherheit bei Anwesenheit fremder Salze, die ja im Harne in so reichlichem Maße auftreten, die Indikatorenmethode, welche prinziviell die einfachste wäre, scheitert an der bereits von vornherein vorhandenen Färbung der Harne.

Die Gaskettenmethode hingegen ist nur mit feineren Apparaten gut ausführbar.

Die Wasserstoffionen-Konzentration, welche ich im Harne zu bestimmen unternahm, wechselt stark mit der Temperatur. Es mußte also auch diese Frage in Erwägung gezogen werden.

Nachdem es vorauszusetzen war, daß die Wasserstoffionen-Konzentration des Harnes, eines Nierenproduktes, nur sehr niedrig sein wird, schien es anfangs am zweckmäßigsten, die Inversion bei der Kochhitze vorzunehmen, da nur in diesem Falle eine merkliche Inversion zu erwarten war. Nun zeigte sich aber, daß durch die auftretende Zersetzung des Harnstoffs in Ammoniak und Kohlensäure der Harn beim Kochen seine Acidität bald verliert und so die Messung irrelevant macht. Auch bei 76° C war eine Harnstoffzersetzung bemerkbar. Erst bei Messungen, welche bei 37° C ausgeführt wurden, konnte von der Harnstoffzersetzung des Harnes, die nunmehr nur in minimalem Grade stattfindet, abgesehen werden. Dabei zeigte es sich, wie von mir erwartet wurde, daß die Konzentration der Wasserstoffionen im Harne sehr gering ist und dieselbe fast gar keine Zuckerinversion zu verursachen imstande ist. Einige Versuche mit reinen Phosphatlösungen ergaben, daß die im Harne vorhandenen sauren Phosphate die minimale Zuckerinversion des normalen Harnes verursachen und erklären. Im Laufe der Untersuchungen haben sich einige merkwürdige Verhalten verschiedener pathologischer Harne ergeben. Auch die Zersetzung des Harnstoffs in Ammoniak und Kohlensäure und die damit parallel verlaufende Neutralisation der primären Phos-

[1]) Salm, Zeitschr. f. physikal. Chem. 57.

phate bietet eine ziemlich interessante Erscheinung dar, welche im experimentellen Teile genau ausgeführt werden soll.

Experimenteller Teil.

Die verschiedenen Harne, die zur Untersuchung gelangten, wurden mit entsprechenden Mengen Rohrzucker versetzt, sodann die Zuckerlösung mit Harn im Meßkolben zur Marke aufgefüllt. Sofort wurde dann die Lösung bei 20° C in einem Halbschattenapparate in einem 200 mm-Rohr polarisiert und auch die Acidität derselben bestimmt. Die so bereiteten Lösungen wurden der Einwirkung verschiedener Temperaturen unterworfen, wobei meistens die Kochhitze, 76° C und 37° C in Betracht kamen. In verschiedenen Intervallen wurde die Drehung und Acidität der so behandelten Harne bestimmt.

Die der Kochhitze unterworfenen Harne zeigten einen sehr raschen Abfall der Acidität, was auf die Entweichung von Kohlensäure aus dem zersetzten Harnstoff und Zurückbleiben der entsprechenden Ammoniakmenge zurückgeführt und durch Untersuchungen vollauf bestätigt wurde.

Die Bestimmung der aus dem gekochten Harne entweichenden Kohlensäure wurde mit dem abgebildeten Apparate ausgeführt.

Im Jenenser Kolben, um ewaige Alkaliabgabe von Glas zu vermeiden, wurde der mit Zucker versetzte Harn gekocht. Das Kochen geschah, wie man aus der Abbildung ersehen kann, unter Benützung eines Rückflußkühlers, welcher das verdampfende Wasser zurückkondensierte. Die sich entwickelnde Kohlensäure wurde durch einen durch den Kolben geführten kohlensäurefreien Luftstrom weggeführt, passierte den Kühler, dann das lange nach abwärts gebogene Rohr und gelangte, nach vollkommenem Trocknen vermittels einer Schwefelsäure-Waschflasche, im Kaliapparate zur Absorption.

Gewöhnlich hat sich bei solchen Bestimmungen auch festes Ammoncarbonat im Kühler kondensiert. Dieses wurde sodann titrimetrisch auf Kohlensäure bestimmt und die Kohlensäuremenge zu der von dem Kaliapparate absorbierten addiert. Um sich auch zu überzeugen, daß die Kohlensäure von der Zersetzung des Harnstoffs in Ammoniumcyanat und Ammoncarbonat in weiterer Linie stammt, wurde im Harne der Harnstoff vor und

nach dem Kochen bestimmt. Den Aciditätsabfall konnte man durch Titration, wie auch durch die Bestimmung der Mono- und Diphosphate vor und nach dem Kochen genau verfolgen,

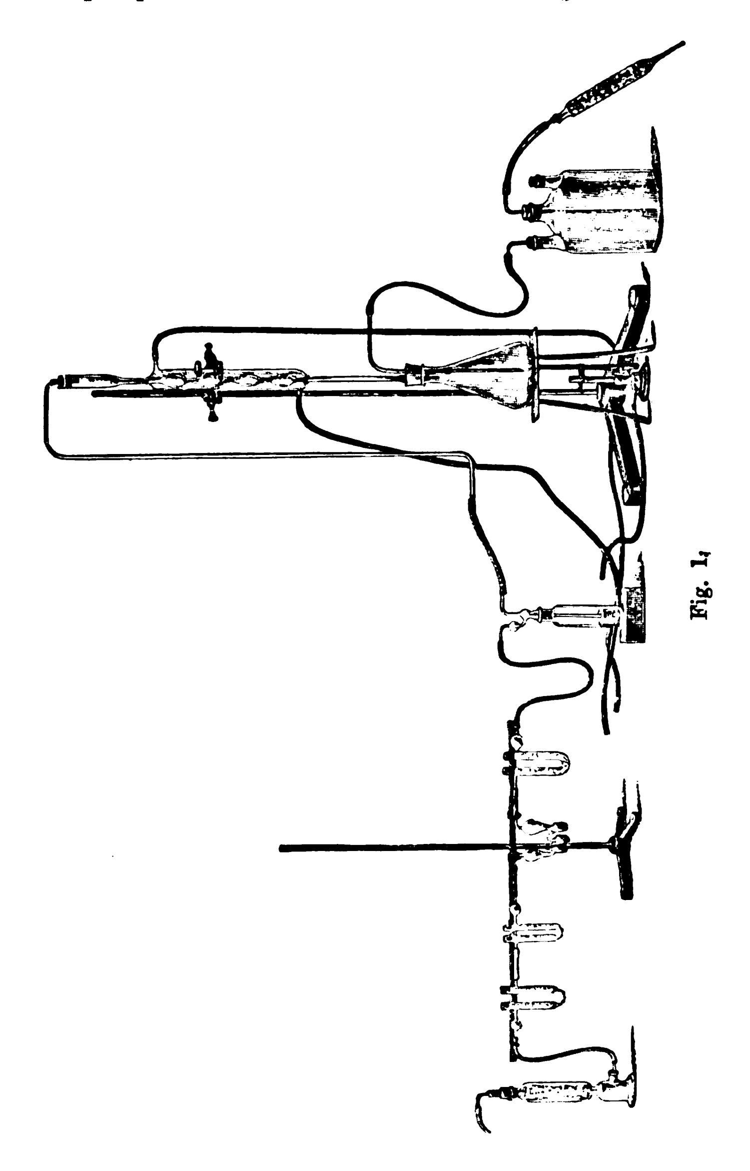


Fig. 1.

da durch das entwickelte Ammoniak die Monophosphate in Diphosphate umgewandelt wurden. Auf diese Weise konnte die

Veränderung, welcher der Harn beim Kochen unterliegt, genau verfolgt werden.

Nachstehend gestatte ich mir eine tabellarische Zusammenstellung der typischen Resultate, die ich bei den untersuchten Harnen erhalten habe, vorzuführen. In der Tabelle ist zuerst die allgemeine Beschaffenheit des Harnes angegeben, sodann die Temperatur der Behandlung. Die Inversionsgeschwindigkeit und Aciditätsäußerung wurde vor der Behandlung und in mehreren Intervallen im Laufe derselben bestimmt. In vier der Kochhitze unterworfenen Harnen wurde sowohl die entwickelte Kohlensäure und die Zersetzung des Harnstoffs, wie auch die Mono- und Diphosphate vor und nach dem Kochen genau bestimmt. Die Rohrzucker-Konzentration war in allen untersuchten Proben sehr nahe 10%ig. Bei allen untersuchten Harnen ist das spezifische Gewicht, bei den Zuckerharnen auch die Eigendrehung vermerkt.

Unter den Abkürzungen bedeuten T. = Tage = 24 Stunden, St. bedeuten Stunden.

Die ersten drei Harne, welche in der Kochhitze stundenlang behandelt wurden, gaben eine Inversion von wenigen Zehntelgraden. Der vierte Harn, welcher in der Kochhitze in 2 Stunden 1,05°, in 6 Stunden 3,65° und in 12 Stunden 4,18° Ablenkungsänderung hervorrief, ist ein Zuckerharn von nicht besonders hoher Acidität. Auch die Zuckerharne 5 und 6 zeigen nach 12stündigem Kochen Ablenkungsänderungen von 14,1° bzw. 3,2°. — Welchem Umstande es zuzuschreiben ist, daß Zuckerharne in der Kochhitze stärker invertieren, ist nicht bekannt. Vielleicht liegt hier nur eine Scheininversion vor, indem sich die im Zuckerharne bereits vorhandene Dextrose irgendwie verändert. Der große Abfall der Acidität ist durch die in hohem Grade auftretende Harnstoffzersetzung sehr gut erklärlich. Ja, wenn das gesamte, aus dem zersetzten Harnstoff entstandene Ammoniak im Harn geblieben wäre und nicht teils in Form von Ammoncarbonat in den Kühler sich niedergeschlagen, teils in der Schwefelsäureflasche gebunden wäre, müßte der Harn nach dem Kochen alkalisch reagieren. — Die entwickelte Kohlensäure stimmt mit der aus dem zersetzten Harnstoff berechneten ziemlich überein. Die große Menge der entweichenden Kohlensäure muß ganz besonders betont werden, da in der Literatur

Laufende. Nr.	Beschaffenheit des Harnes	Temperatur der Behandlung °C	Ablenkungswinkel (Grade der Zuckerskala)					Acidität (Zahl der verbrauchten ccm n-Lauge pro Liter mit Rohrzucker versetztem Harn)				
			am Anfang	nach	nach	nach	nach	zu Anfang	nach	nach	nach	nach
1	normal	Kochhitze	38,05	12 St., 37,65	—	—	—	36	12 St., 4	—	—	—
2	enthält Gallenfarbstoff	"	37,90	12 St., 37,35	—	—	—	35,4	12 St., 6,7	—	—	—
3	enthält Albumin	"	37,90	12 St., 37,25	—	—	—	41,2	12 St., 7,8	—	—	—
4	Zuckerharn	"	45,7	2 St., 44,65	6 St., 42,05	12 St., 40,88	—	42	12 St., 2,6	—	—	—
5	Zuckerharn	"	55,2	2 St., 51,6	6 St., 45,75	12 St., 41,10	—	24	12 St., alkal.	—	—	—
6	Zuckerharn	"	41,1	2 St., 40,3	6 St., 38,65	12 St., 37,9	—	76	6 St., 50	12 St., 30	—	—
7	normal	90	38,12	5 St., 38,10	—	—	—	52	—	—	—	—
8	Uratharn	80	38,30	2 T., 38,30	4 T., 37,10	6 T., 36,00	—	58	—	—	—	—
9	normal	76	38,15	7 T., 37,50	—	—	—	31	6 T., alkal.	—	—	—
10	normal	76	38,10	2 T., 38,10	—	—	—	51	2 T., 50	—	—	—
11	normal	37	38,05	1 T., 38,00	8 T., 37,65	11 T., 37,5	—	41,4	1 T., 42	8 T., 50	11 T., 50	—
12	normal (Zus. 1 1/2 g NaFl)	37	38,10	1 T., 38,10	2 T., 37,55	6 T., 34,9	20 T., 27,5	32	1 T., 32	2 T., 30	6 T., 29	20 T., 24
13	Uratharn	37	38,00	5 T., 36,10	9 T., 31,50	11 T., 29,10	—	50	3 T., 56,4	5 T., 88	7 T., 104	11 T., 93
14	Uratharn	37	38,15	1 T., 38,00	2 T., 37,53	13 T., 35,0	—	59	1 T., 58	2 T., 55	13 T., 40	—
15	Zuckerharn Aceton, Acetessigsäure	37	57,6	6 T., 57,4	—	—	—	6	1 T., 5,6	6 T., 3	—	—
16	Coliharn	37	38,17	24 St., 15,62	—	—	—	40	24 St. 40	—	—	—

Angaben zu finden sind, denen zufolge der Kohlensäureverlust des Harnes beim Kochen als gering geschätzt wird.[1]) Trotz des raschen Aciditätsabfalles ist die Inversionsfähigkeit der Harne bei der Kochhitze relativ größer als bei niedrigeren Temperaturen, ein Umstand, der einen hohen Temperaturkoeffizienten vermuten läßt.

Die bei 37° C untersuchten Harne zeigen im allgemeinen die geringste Inversionsfähigkeit. Nur ein Coliharn zeigte in einem Tage die erhebliche Ablenkungsänderung von 9,64° V. — Uratharne mit hoher Acidität zeigen keine solche Ausnahme.

Merkwürdig ist noch eine Tatsache. In mehreren Fällen konnte eine mit der Zeit steigende Inversionsfähigkeit beobachtet werden.

[1]) Malfatti, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 8, 473, 1906.

Monophosphate in g P_2O_5 pro Liter		Δ Differenz gefunden	Δ Differenz berechnet	Diphosphate in g P_2O_5 pro Liter		Entwickelte Kohlensäure (gefunden)	Kohlensäure aus dem zersetzten Harnstoff berechnet	Harnstoff in g pro Liter		Zersetzter Harnstoff in g pro Liter	Spez. Gewicht des Harnes bei 15° C	Eigendrehung (bei Zuckerharnen)
vor	nach			vor	nach			vor	nach			
1,4420	0,1284	1,3136	1,1488	0,3718	1,5206	2,5835	2,437	22,846	19,522	3,324	1,022	—
1,642	0,473	1,169	1,165	0,644	1,809	2,9293	2,830	22,84	18,98	3,86	1,024	—
1,384	0,109	1,275	1,1981	0,3004	1,4985	2,535	2,409	21,246	17,960	3,286	1,021	—
1,50	0,1308	1,3692	1,300	0,496	1,796	3,083	2,943	24,73	20,716	4,014	1,030	+ 8,2°
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,036	+ 18,2°
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,024	+ 3,05°
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,021	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,024	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,019	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,027	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,022	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,026	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,027	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,028	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,033	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,016	—

So im Uratharne 8 bei 80° C, im normalen Harne 12 bei 37° C., welchen behufs Gärungsvermeidung 1½ g Fluornatrium zugesetzt wurden.

Auch zeigen die zwei bei 37° C untersuchten Uratharne 13 und 14 ganz deutlich diese Erscheinung. Worauf dieses Verhalten, welches so sehr einer Autokatalyse ähnelt. zurückzuführen ist, kann zurzeit nicht beantwortet werden. Ein Schluß kann aus allen Tatsachen sicher gezogen werden:

Die Wasserstoffionen-Konzentration im Harne ist eine sehr geringe. Die sehr geringe Inversionsfähigkeit der Harne ist ein ausgezeichneter Beleg dafür.

Die so niedrige Konzentration der Wasserstoffionen entspricht annähernd der im Harne vorhandenen Menge von Mononatriumphosphat. Wird nämlich Mononatriumphosphat in solchen Mengen, wie es in dem Harne vorkommt, mit Rohrzucker-

lösung behufs Inversion versetzt, so ruft es eine Ablenkungsänderung hervor von derselben Größenordnung, wie es beim Harne der Fall war, z. B.:

NaH_2PO_4	Ablenkungswinkel			
	sofort	nach	nach	nach
4 g im Liter	38,20°	24 St. 38,20°	6 T. 38,10°	
4 g im Liter + 4 g Diphosphat	38,38°	24 St. 38,38°	6 T. 38,30°	8 T. 38,30°

Die Zuckerlösungen waren ca. 10%ig. Das primäre Natriumphosphat, von Merck bezogen, enthielt 22,59% P_2O_5, welche Tatsache dahin deutet, daß das Präparat etwas verwittert war. Die Inversionsfähigkeit des sauren Phosphats unter den obigen Bedingungen ist ebenso wie die des normalen Harnes kaum merklich.

Auf Grund dieser Tatsache muß der allgemeinen Meinung, daß das Monophosphat die Acidität des Harnes bedingt, beigestimmt werden, hingegen der Behauptung des Herrn Dr. B. Wagner[1]), daß es organische Säuren sind, entschieden widersprochen werden, da organische Säuren viel stärker invertieren müßten und sich in freiem Zustande bei Gegenwart von sekundären Phosphaten überhaupt nicht behaupten könnten.

Das Hauptergebnis, welches für die Methodik zur Untersuchung der Wasserstoffionen-Konzentration vermittels Rohrzuckerinversion von Wichtigkeit ist, ist die Tatsache, daß einwandfrei nur eine niedrige Versuchstemperatur, wie z. B. 37° C, ist. Bei höheren Temperaturen wirkt die Harnstoffzersetzung des Harnes sehr störend. — Die Wasserstoffionen-Konzentration läßt sich zahlenmäßig wegen der sehr geringen Inversionsgeschwindigkeit überhaupt nicht zum Ausdruck bringen. Als die beste Methode, die auch zahlenmäßige Resultate liefern könnte, muß die von mir bereits erwähnte Gaskettenmethode bezeichnet werden.

[1]) Über die Ursache der sauren Reaktion des Harns. Chem.-Zeitg. 1907, 485.

Ein Beitrag zur Chemie der amyloiden Entartung.

Von

Olav Hanssen, Christiania.

(Arbeiten aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

(Eingegangen am 25. August 1908.)

I.

Die chemische Klarstellung der amyloiden Entartung wird sehr erschwert durch den Umstand, daß die Isolierung des Amyloids von dem übrigen Gewebe auf große Schwierigkeiten stößt. Die ersten Untersucher (C. Schmidt, Friedreich und Kekulé) haben von dieser Schwierigkeit einfach abgesehen und das amyloidentartete Gewebe ohne eingreifende chemische oder mechanische Vorbehandlung als solches der Analyse unterzogen. Dabei ist die Voraussetzung gemacht, daß das untersuchte Gewebe ganz oder doch nahezu ganz aus der amyloiden Substanz besteht, eine Annahme, die sicher nicht entfernt zutrifft.

Spätere Autoren unter Vorantritt Kühnes haben dagegen die durch ihre geringe Angreifbarkeit durch Pepsin und Salzsäure ausgezeichnete Substanz mittels anhaltender Pepsinverdauung zu isolieren gesucht und sie dann weiter gereinigt. Aber auch dieser Weg unterliegt mehrfachen Bedenken.

Der bei Pepsinverdauung unangegriffen gebliebene Rest enthält naturgemäß auch die durch Pepsin schwer angreifbaren Teile des normalen Gewebes beigemengt. Sodann ist das durch Verdauung isolierte Amyloid sicher nicht mehr mit dem ursprünglichen identisch, da es im Gegensatz zur genuinen Substanz in Ammoniak ganz leicht löslich ist und die typische Jodreaktion nicht mehr darbietet. Endlich bleibt die Möglichkeit, daß während der Verdauung sekundäre Vorgänge Platz

greifen, durch die es zur Bildung von Stoffen kommt, die nach Analogie der Nucleine für Pepsin schlecht angreifbar sind, und daß somit das durch Verdauung erhaltene Amyloid ein Gemenge ist, dessen Beziehung zum Amyloid erst näherer Aufklärung bedürfte.

Auf Veranlassung von Herrn Professor Hofmeister habe ich zur Isolierung des Amyloids einen anderen Weg eingeschlagen, den der mechanischen Trennung. Dazu stellten die „Sagokörner" der Amyloidmilz das günstigste Material dar.

Nachträglich hat sich bei eingehenderem Studium der Literatur ergeben, daß Virchow[1]) bereits in der grundlegenden Abhandlung, in der er zum erstenmal die Jodschwefelsäurereaktion beschreibt, auf eine solche mechanische Isolierung der Sagokörner hingewiesen hat.

Er schreibt: „Ich wollte den Versuch machen, durch anhaltende Maceration die Körner in einer ähnlichen Art zu isolieren, wie man es bei der Stärkebereitung zu tun pflegt, und stellte daher die Milz unter einen kontinuierlich fließenden Wasserstrahl. Sollte es gelingen, auf diese Weise die Körner frei zu machen, so würde man das Material zu einer geordneten chemischen Untersuchung in hinreichender Masse gewinnen können und schon aus diesem Grunde ist die Auffindung eines solchen Objekts gewiß sehr wertvoll."

Dieser Fingerzeig hat anscheinend bisher keine Berücksichtigung gefunden. Vermutlich ist der Versuch, wenn er gemacht wurde, an technischen Schwierigkeiten gescheitert.

Bevor ich an die Wiedergabe meiner einschlägigen Versuche gehe, sei ein kurzer Überblick der bisher ausgeführten chemischen Untersuchungen gegeben.

Carl Schmidt[2]) bestimmte den Stickstoffgehalt von 30 g in Brei verwandelter amyloider Milz. Er fand darin ebensoviel Stickstoff wie in Proteinstoffen.

Friedreich und Kekulé[3]) untersuchten eine starke Amyloidreaktion gebende knotenförmige Bildung in einer syphilitischen Schinkenmilz. Das nach Auskochen mit Wasser, Extraktion mit Alkohol und Äther, Abschlämmen von Gefäß-

---

[1]) Virchows Archiv **6**, 268, 1854.

[2]) Annal. d. Chem. u. Pharm. **84**, 250, 1859.

[3]) Virchows Archiv **16**, 50, 1859.

resten usw. erhaltene Pulver ergab: C = 53,58 %, H = 7,00 %, N = 15,04 %.

Kühne und Rudneff[1]) fanden für das durch Pepsinverdauung und Lösung in Ammoniak erhaltene Amyloid, ein so erhaltenes Amyloidpräparat sei kurz „Verdauungsamyloid" genannt, 15,53 % Stickstoff, 1,3 % Schwefel, 0,79 % Phosphor.

Im Jahre 1894 wies Oddi[2]) in Schmiedebergs Laboratorium in amyloidentarteter Leber das Vorkommen einer Verbindung vom Verhalten der Chondroitinschwefelsäure nach, lehnte jedoch eine Beteiligung dieser Säure am Aufbau des Amyloids ab.

Krawkow[3]) kam demgegenüber in einer im gleichen Laboratorium ausgeführten Arbeit zum entgegengesetzten Schlusse. Er fand Chondroitinschwefelsäure konstant in amyloiden Organen, in Leber, Nieren und Milz. Er isolierte das Amyloid in folgender Weise. Nach Auswaschen der Organe mit verdünntem Ammoniak bis das Filtrat keine Reaktion auf Chondroitinschwefelsäure mehr gab, wurden sie mit Pepsinsalzsäure tagelang verdaut. Der unverdaute Rest wurde in Ammoniak gelöst, die Lösung mit Säure gefällt, und der Niederschlag durch Lösen in Barytwasser von Nuclein befreit. Das phosphorfrei erhaltene Verdauungsamyloid enthielt C = 49 bis 50 %, H = 6,65 bis 7 %, N = 13,8 bis 14 %, S = 2,65 bis 2,9 % und lieferte bei der Spaltung Chondroitinschwefelsäure.

Krawkow zufolge wäre das Amyloid eine Verbindung von Chondroitinschwefelsäure mit einem Eiweißkörper, er vermutet, daß die Chondroitinschwefelsäure die Farbenreaktionen des Amyloids vermittele. Krawkow gebührt ferner das Verdienst, auch im normalen Organismus an verschiedenen Stellen, z. B. in der Aortenwandung des Pferdes, dem Nackenband vom Rind, im Stroma der Kalbsmilz, der Schleimhaut des Schweinemagens, amyloidähnliche Substanzen nach demselben Verfahren nachgewiesen zu haben.

Eine genauere Untersuchung des im Verdauungsamyloid enthaltenen Eiweißkörpers führte Neuberg[4]) aus. Er stellte es genau nach Krawkow dar. Sowohl die Hydrolyse des

[1]) Virchows Archiv 33, 66, 1865.

[2]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 33, 377, 1894.

[3]) Ebenda 40, 195, 1898.

[4]) Verhandl. d. deutsch. pathol. Ges. 1904, 19.

Leberamyloids wie die Bestimmung der Stickstoffverteilung am Milzamyloid ergab einen sehr hohen Gehalt an basischen Gruppen. Hingegen verhielt sich das Aortenamyloid sowohl in diesem Punkte wie auch im Gehalt an gepaarter Schwefelsäure und nicht oxydiertem Schwefel ziemlich abweichend:

Amyloid aus	Monaminosäuren-N %	Diaminosäuren-N %	Amid-N %	Sulfat-S %	Nichtoxyd. S %
Leber . . .	43,2	51,2	4,9	1,7	0,9
Milz . . .	30,6	57,0	11,2	1,8	0,0
Aorta . . .	54,9	36,0	8,8	0,4	1,9

Die vorliegenden Angaben über das durch Verdauung isolierte Amyloid geben genügende Anhaltspunkte zur Entscheidung der Frage, ob es mit dem genuinen, mechanisch isolierbaren Amyloid identisch ist.

II.

Isolierung und analytische Untersuchung des mechanisch isolierten Amyloids.

Das Material zu den nachfolgenden Versuchen verdankt das physiologisch-chemische Institut in erster Reihe dem liebenswürdigen Entgegenkommen des Herrn Prof. Chiari (hier), sodann der Herren Prof. Albrecht (Frankfurt), Bollinger (München), Hedinger (Basel), Kretz (Prag), Lubarsch (Düsseldorf), Marchand (Leipzig), Schmorl (Dresden), denen hiermit auch hier der ergebenste Dank für die wertvolle Unterstützung ausgesprochen sei.

Die Isolierung der Sagokörnchen gestaltete sich wie folgt: Die Milzen wurden in dünne Lamellen zerschnitten, aus diesen teils mit der Pinzette, teils mit dem Messer die Sagokörner herausgedrückt und herausgeschabt. Der Brei wurde mit destilliertem Wasser in der Schüttelmaschine andauernd heftig geschüttelt, dann in viel Wasser suspendiert, worauf sich die Körner zuerst am Boden absetzten, während die Gewebsflocken noch suspendiert blieben.

Durch häufiges Aufrühren mit Wasser und Dekantieren erhielt man zum Schluß einen fast nur aus Körnern bestehenden Bodensatz, der von den letzten Gewebsresten und den öfter

vorhandenen Pigmentkörnchen mit der Pinzette sorgfältig befreit wurde.[1])

Nicht in allen Fällen gelang es, die Sagokörner von Gefäßresten zu befreien. Solches minder homogene Material wurde zu Verdauungs- und Tinktionsversuchen benutzt. Die nachstehend mitzuteilenden chemischen Untersuchungen sind an ganz homogenem, ausschließlich aus runden oder elliptischen Körnern bestehendem Material ausgeführt.

Die Körner wurden nach völligem Auswaschen mit destilliertem Wasser bei 40° getrocknet, dann pulverisiert und über konzentrierter Schwefelsäure im Vakuum endgültig zur Trockne gebracht.

Das gelbliche oder bräunliche Pulver gab mit Jod eine rotbraune Färbung, die nach Zusatz verdünnter Schwefelsäure in Blauviolett oder Blauschwarz überging. Es gab alle Eiweißreaktionen: die Biuret-, Xanthoprotein-, Schwefelblei-, Millonsche, Molischsche und Hopkinssche Probe; es enthielt keinen oder nur Spuren Phosphor.

Der Aschengehalt wurde in einer Probe von 0,095 g zu 0,0007 gefunden, war sonach sehr gering. Die Asche bestand vorwiegend aus Eisenoxyd. Daneben war eine eben nachweisbare Spur Phosphorsäure vorhanden. Schwefelsäure war nicht nachweisbar.

Die Analyse ergab für drei verschiedene Präparate:

%	Präparat I	Präparat II	Präparat III
C	48,49	51,87	52,79
H	7,24	7,58	7,46
N	14,23	15,17	15,62
S	—	—	1,26
C/N . . .	3,41	3,42	3,38

Wie man sieht, ist das Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff in allen Präparaten identisch. Die Unterschiede im absoluten Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt dürften daher auf einen ungleichen Wassergehalt zu beziehen sein.

Die Untersuchung der Schwefelbindung ergab, daß das Pulver der Sagokörner, wenn es wie oben bereitet wurde, nur

---

[1]) H. Nasse hat ein ähnliches Verfahren zur Isolierung der Pigmentkörner aus der Pferdemilz benutzt. — (Zur Erinnerung an Wilhelm Roser von der medizinischen Fakultät zu Marburg. Marburg 1890.)

nichtoxydierten Schwefel enthielt. Es wurde nach Zerkochen mit Salzsäure auf Zusatz von Chlorbarium kein oder nur eine kaum wägbare Menge Bariumsulfat erhalten.

	Menge der Substanz g	$BaSO_4$ g
Präparat V . . .	0,1110	—
„ III . . .	0,0973	0,0001
„ II . . .	0,1370	0,0007

Ein Präparat (I), das abweichend von obiger Vorschrift mit Leitungswasser dargestellt worden war, ergab auf 0,1083 g Substanz 0,0020 g $BaSO_4$, was auf die Verwendung des nicht sulfatfreien Leitungswassers zu beziehen ist. Übrigens wies das Milzgewebe aus dem dieses Präparat dargestellt worden war, nahezu denselben Sulfatgehalt auf.

Da bei der geringen Ausbeute an mechanisch isoliertem Amyloid nur geringe Substanzmengen zur Verwendung kommen konnten, so sei, um etwaigen Zweifeln zu begegnen, hervorgehoben, daß die Menge Bariumsulfat, die nach Krawkow zu erwarten gewesen wäre, weit außerhalb der Fehlergrenzen liegt. So hätten bei einem Schwefelgehalt des Amyloids von 2,65% Präparat V 0,0204 g, Präparat III 0,0179 g und Präparat II 0,0252 g $BaSO_4$ ergeben müssen.

Diese Zahlen zeigen, daß das von mir untersuchte mechanisch isolierte Amyloid und das durch Verdauung gereinigte gänzlich verschieden sind. Es geht dies einfach aus der Zusammenstellung der von Neuberg für Milzamyloid gefundenen Daten mit meinen hervor:

	Sulfat-S	Nichtoxyd. S
Verdauungsamyloid . . .	1,8	0,0
Mechanisch isoliertes Amyloid	0,0	1,26

Das mechanisch isolierte, sonst intakte Amyloid enthält, obgleich es alle typischen Eigenschaften des Amyloids besitzt, keine gepaarte Schwefelsäure, somit auch keine Chondroitinschwefelsäure.

III.

Das Verhalten des mechanisch isolierten Amyloids gegen Fermente und chemische Reagenzien.

Daß das genuine Amyloid proteolytischen Fermenten mehr widersteht als andere Eiweißstoffe, ist schon den älteren Autoren bekannt gewesen und hat in der von Kühne eingeführten Darstellungsmethode mittels Pepsin ihren Ausdruck gefunden.

Trotzdem gehen die Angaben über das Verhalten des Amyloids gegen Fermente auseinander, hauptsächlich wohl, weil die betreffenden Versuche teils mit dem rohen anatomischen Material, teils mit dem „Verdauungsamyloid" angestellt wurden. Auf letzteres beziehen sich auch die letzten einschlägigen Versuche von Neuberg[1]). Es ist daher nicht überflüssig, über meine an mechanisch isoliertem Amyloid gesammelten Erfahrungen zu berichten.

Verdauung mit Pepsin und Salzsäure verändert die Körnchen so, daß sie in schwachem Ammoniak löslich werden. In der Regel nach wenigen Stunden, jedenfalls nach 24 Stunden geht dabei die Jod- und Jodschwefelsäurereaktion verloren, während die Färbbarkeit mit Methylviolett erhalten bleibt. Mit v. Giesonscher Lösung färben sich die Körnchen vor wie nach der Verdauung in gleicher Weise gelbrot. Eine Auflösung der Körnchen in Pepsinsalzsäure erfolgt selbst bei monatelanger Digestion nicht.

Eine Probe von noch etwas unreinen Körnchen wurde mit Pepsin verdaut, dann in Ammoniak und später in Barytwasser gelöst. Der aus der alkalischen Lösung mit Essigsäure ausfallende Niederschlag wurde mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und neuerdings in wenig Ammoniak gelöst. Die Lösung gab mit Essigsäure einen im Überschuß unlöslichen Niederschlag, fiel mit gesättigtem Ammonsulfat bei Zusatz des halben Volums ($^1/_3$-Sättigung), gab keine Schwefelblei- und eine nur zweifelhafte Molischsche Probe. Doch sei bemerkt, daß das trockne Präparat von schmutzig-gelber Farbe war.

Gut wirksames Trypsin und Erepsin hatten weder auf die morphologischen noch auf die tinktoriellen Eigenschaften einen erkennbaren Einfluß. Monatelang fortgesetzte Autolyse von Sagomilz oder auch der isolierten Sagokörner war ohne Wirkung, ebenso die Digestion mit dem sonst stark proteolytisch wirksamen Auszug einer Phosphorleber und mit einer Fermentlösung aus Empyemeiter, die leicht und schnell Eiterzellen löste.

In einem Versuche wurden Sagokörnchen einem Kaninchen in einem Seidenbeutel intraperitoneal beigebracht. Sie wurden nach fünf Wochen morphologisch und tinktoriell unverändert gefunden.

---

[1]) a. a. O.

Über die Resorbierbarkeit der Amyloidkörner nach Einbringung in die vordere Augenkammer hoffe ich später berichten zu können.

Bei der Untersuchung des Sagoamyloids gegen chemische Reagenzien habe ich vor allem das Verhalten der Farbenreaktionen im Auge gehabt. Mit dem Nachweis, daß typisches Amyloid keine Chondroitinschwefelsäure zu enthalten braucht, fällt die Vermutung Krawkows, daß die Chondroitinschwefelsäure Trägerin der Farbstoffreaktionen ist. Hingegen bot es Interesse zu prüfen, inwieweit die Jod- bzw. Jod-Schwefelsäurereaktion und die Färbbarkeit durch Methylviolett chemischen Einwirkungen unterliegt. Als Material dienten teils unreine Sagokörner, teils eine pulverisierte Amyloidmilz, die sehr deutliche Jod-Schwefelsäurereaktion darbot. Für die Methylviolett-tinktion benutzte ich ausschließlich Sagokörner. Denn, so deutlich die Methylviolettreaktion am besten unter Verwendung von verdünnter Essigsäure mikroskopisch an frischen Schnitten hervortritt — hier dient das normale Gewebe gewissermaßen als Kontrollpräparat —, so schwierig ist der Ausfall der Färbung bei pulverförmigem Material makroskopisch zu beurteilen. Pulverisiertes Fibrin und fettfreies Casein geben bei entsprechender Behandlung eine Methylviolettfärbung, die schwer, wenn überhaupt, von der des pulverisierten Amyloids zu unterscheiden ist. Ganz anders prägnant ist die Jod-Schwefelsäurereaktion, die überdies an den isolierten Sagokörnern immer schöner und charakteristischer hervortritt als im Gewebe selbst.

Bei den nachstehend angeführten Proben ließ ich die Lösungsmittel und Reagenzien stets 36 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur einwirken.

Extraktion mit Alkohol, Äther, Benzol, Aceton, Petroläther war ohne Einwirkung. Ebenso Behandlung mit Kochsalz, Bariumchlorid, Magnesiumsulfat und anderen Salzen. Hingegen hob die Einwirkung von Alkalien die Färbbarkeit mit Jod-Schwefelsäure auf, und zwar Natronlauge etwa als $^n/_{50}$-, Ammoniak etwa als $^n/_{15}$-Lösung. Ebenso wirkten Kalk- und Barytwasser. Natrium- und Ammoniumcarbonat waren erst in sehr starker Konzentration in gleichem Sinne wirksam. Pyridin und Anilin hatten keinen Einfluß, ebensowenig mäßig verdünnte Mineralsäuren.

Durch Alkalien wie durch Pepsinsalzsäure verliert sonach das Amyloid seine Färbbarkeit durch Jod und Schwefelsäure. Es kann dies so gedeutet werden, daß das Amyloid von vornherein ein Gemenge eines Eiweißkörpers mit einem jodaffinen Körper darstellt, der dann jedenfalls in den gebräuchlichen Lösungsmitteln unlöslich ist, oder daß der im Amyloid enthaltene Eiweißkörper eine jodaffine Gruppe besitzt, die durch Alkali und Pepsin verändert wird.

Es wurde mehrfach der Versuch gemacht, den vermuteten jodaffinen Gemengteil durch verdünntes Alkali z. B. $^{n}/_{20}$-Lauge, zu extrahieren. Doch gelang es nie, nach vorsichtigem Einengen im Extrakt die Jodreaktion wiederzufinden. Auch wenn der Extrakt mit dem Rückstand nachträglich zusammengebracht wurde, blieb die Jodreaktion mit und ohne Säure aus. Wie das Verschwinden der Jod-Schwefelsäurereaktion zu deuten ist, muß sonach vorläufig dahingestellt bleiben.

Hingegen wird die Methylviolettreaktion durch die verschiedensten Prozeduren nicht berührt. Ich habe überhaupt keinen Eingriff gefunden, der ohne direkte Veränderung des Eiweißsubstrats die Färbbarkeit durch Methylviolett aufgehoben hätte.

Man kann daraus mit großer Wahrscheinlichkeit folgern, daß die Färbbarkeit durch Methylviolett — und andere ähnliche Farbstoffe — dem Eiweißsubstrat des Amyloids — man kann es vorläufig das Amyloidprotein nennen — zukommt, die Jodreaktion aber einer unbekannten, sehr veränderlichen beigemengten Substanz oder einem labilen, dem Amyloidprotein selbst zugehörigen Komplex. Über die Zuverlässigkeit der Jod- und der Methylviolettreaktion für die Diagnose des Amyloids ist daraus an sich nichts zu entnehmen, wohl aber ist sicher, daß sie im chemischen Sinne nicht die gleiche Bedeutung haben.

IV.

Über das Vorkommen von Chondroitinschwefelsäure bei Amyloidose.

Durch den Nachweis, daß typisches anatomisches Amyloid keine Chondroitinschwefelsäure zu enthalten braucht, ist die Bedeutung dieser Säure für die amyloide Degeneration, die man

nach **Krawkows** Untersuchungen außerordentlich hoch angeschlagen hat, wieder zweifelhaft geworden. Wohl ist ihre Gegenwart in amyloidentarteter Leber, Milz und Niere nachgewiesen, ob sie aber bei Amyloidose nicht auch in anderen nicht amyloidentarteten Organen vorkommt, scheint nicht untersucht zu sein. Auch ich war nicht in der Lage, diesen Punkt klarzustellen.

Hingegen habe ich mich über das konstante Vorkommen der Chondroitinschwefelsäure in amyloidentarteten Organen (Milz und Leber) sowie über ihre Quantität durch eine Anzahl von Bestimmungen zu unterrichten gesucht.

Die Analysen wurden so ausgeführt, daß das trockene Material 6 bis 7 Stunden mit konzentrierter Salzsäure hydrolysiert und im Filtrat die Gesamtschwefelsäure in gewöhnlicher Weise bestimmt wurde. Kontrollversuche lehrten, daß 6 bis 10 stündiges Kochen zur völligen Aufspaltung hinreicht. Die unvermeidliche Bildung von „Melanin“ stört die Bestimmung nicht nachweisbar. Wenigstens hatte ein Zusatz von Tannin, wodurch die Melaninbildung stark befördert wird, keinen merklichen Einfluß.

Es ist nicht überflüssig, hervorzuheben, daß dieses analytische Verfahren nicht Chondroitinschwefelsäure an sich, sondern freie und gepaarte Schwefelsäure bestimmt. Da auch normale Organe gepaarte Schwefelsäure enthalten können, wurde eine Anzahl von Kontrollbestimmungen an nicht amyloidentarteten Organen ausgeführt.

Nachstehend gebe ich die von mir gefundenen Werte für Sulfatschwefel in tabellarischer Übersicht:

Organe	Sulfatschwefel	Organe	Sulfatschwefel
1 Milz normal	0,035 %	1 Sagomilz	0,127 %
2 „ „	0,021 %	2 „	0,100 %
3 „ „	0,028 %	3 „	0,145 %
4 „ „	0,029 %	4 „	0,143 %
5 „ „[1]	0,033 %	5 „	0,051 %
Mittel:	0,029 %	6 Schinkenmilz	0,100 %
		7 „	0,169 %
		Mittel:	0,119 %

[1]) Knochentuberkulose ohne Amyloidose.

Organ	Sulfatschwefel	Organ	Sulfatschwefel
1 Leber, normal	0,041 %	1 Leber, amyloid	0,138 %
2 „ „	0,021 %	2 „ „	0,149 %
		3 „ „	0,110 %
		4 „ „	0,067 %
		5 „ „	0,047 %
1 Niere, normal	0,085 %	1 Niere, amyloid	0,100 %
2 „ „	0,066 %	2 „ „	0,073 %

Wie die Tabelle lehrt, ist der Unterschied im Gehalt an Sulfatschwefel zwischen normaler und amyloidem Organ bei Milz und Leber sehr deutlich. Nur in einem Fall von Amyloidose (Sagomilz 5 und Amyloidleber 5) war an beiden Organen die Abweichung von der Norm auffallend gering.

Aus den oben für Milz angeführten Werten läßt sich eine Vorstellung über die durchschnittlich in Amyloidmilz erfolgende Anhäufung von Chondroitinschwefelsäure gewinnen. Der Unterschied im Sulfatschwefel zwischen normaler und entarteter Milz beträgt im Mittel 0,09 %, was bei einem Schwefelgehalt der Chondrotinschwefelsäure von 5 bis 6 % ca. 2 % Chondroitinschwefelsäure entspräche.

Bei der Amyloidniere ist der Unterschied wenig deutlich. Das kann in der relativ geringen Verbreitung des Amyloids in der Niere begründet gewesen sein. Dazu kommt aber, daß die Niere schon von vornherein Chondroitinschwefelsäure enthalten kann. K. A. Mörner hat in der normalen Rinderniere,[1]) Krawkow in der Menschenniere Chondroitinschwefelsäure gefunden. Mörner hat sie im normalen Menschenharn nachgewiesen, und Pons bestimmte sie darin quantitativ.

Ob das in amyloiden Organen gefundene Plus schlechtweg auf Chondroitinschwefelsäure bezogen werden soll, wie das bisher geschehen ist, möchte ich dahingestellt sein lassen. Ich möchte nur hervorheben, daß der Nachweis der Chondroitinschwefelsäure im Amyloid bisher nur durch qualitative Reaktionen geführt ist, die die Anwesenheit einer kohlenhydratreichen gepaarten Schwefelsäure dartun, und daß C. Th. Mörners und Schmiedebergs Chondroitinschwefelsäure jetzt nicht mehr die einzige Verbindung dieser Art ist.

---

[1]) Eine von mir untersuchte amyloidentartete Rinderniere zeigte einen Gehalt an Sulfatschwefel von nur 0,071 %.

Bemerkenswert ist, daß in einem Fall von Knocheneiterung, wo die klinische Diagnose auf Amyloiddegeneration gestellt war, wo aber die Obduktion nur in der Thyreoidea deutliche Entartung nachwies, die Milz normale Sulfatschwefelzahlen ergab, und auch in der Leber nach Mörners Methode keine Chondroitinschwefelsäure nachgewiesen werden konnte.

Wenn nach dem früher Ausgeführten eine Beteiligung der Chondroitinschwefelsäure (bzw. einer gepaarten Schwefelsäure) an dem Aufbau des Amyloids abgelehnt werden muß, so besteht doch die Beobachtung zu Recht, daß amyloide Organe einen erhöhten Gehalt daran aufweisen. Soweit das Untersuchungsmaterial ein Urteil gestattet, hat es den Anschein, daß dieselben pathologischen Prozesse, die zur amyloiden Entartung führen, zugleich eine Vermehrung von Chondroitinschwefelsäure zur Folge haben.

Vielleicht läßt sich aus dieser Koinzidenz erklären, daß das „Verdauungsamyloid" Chondroitinschwefelsäure enthält, das mechanisch isolierte aber nicht. Die Chondroitinschwefelsäure fällt ähnlich wie die Nucleinsäure in saurer Lösung Eiweißstoffe, und es ist sehr wohl denkbar, ja von vornherein zu erwarten, daß die bei Pepsinverdauung in Lösung gehenden Eiweißstoffe sich bei Anwesenheit von Chondroitinschwefelsäure mit dieser verbinden und so dem für Pepsin unangreifbaren eigentlichen Amyloid beimengen. Ich bemerke jedoch, daß ich Versuche zur Sicherstellung dieser Vermutung noch nicht ausgeführt habe.

V.

Über den Amyloid-, Fett- und Wassergehalt amyloidentarteter Organe.

In der Literatur liegen zerstreut spärliche Angaben über die chemische Zusammensetzung amyloid entarteter Organe vor (Frerichs[1]), Dickinson[2]) u. a.). Über die Menge der abgelagerten amyloiden Substanz geben sie keinen Aufschluß.

Bei Erörterung der so oft ventilierten Frage, Infiltration oder Degeneration hat man die Vergrößerung der amyloiden Organe als Beweis für die Infiltrationstheorie ins Feld geführt,

---

[1]) Die Brightsche Krankheit, 1851, S. 126. — Klinik der Leberkrankheiten, 1861, S. 165.

[2]) Virchows Jahresber., 3, 1, 229, 1869.

wobei vorausgesetzt wurde, daß die Vergrößerung auf einer entsprechenden Einlagerung von amyloider Substanz beruht.[1])

Hierzu steht die Ausbeute an amyloider Substanz, obgleich die Verdauungsmethode nach obigem eher zu hohe als zu niedrige Werte liefern muß, in scharfem Gegensatz. Monery[2]), der nach Krawkows Methode arbeitete, erhielt aus stark degenerierter feuchter Leber nur 0,40 g Substanz pro Kilo.

Ich selbst habe mehrmals aus 200 g lufttrockner Amyloidleber durch Verdauung so wenig Substanz erhalten, daß sich die Verarbeitung nicht lohnte. Krawkow und Neuberg berühren diese Frage nicht.

Es besteht sonach in diesem Punkte eine große Differenz zwischen der Auffassung der Pathologen und dem tatsächlichen chemischen Befund.

Da die beobachtete Volumzunahme amyloider Organe auch auf vermehrtem Wasser- und Fettgehalt beruhen könnte, habe ich eine Reihe solcher Bestimmungen vorgenommen.

Es wurden mit scharfem Messer aus frischer Amyloidmilz dünne Lamellen entnommen und bei 110° zur Gewichtskonstanz gebracht. Zur Fettbestimmung wurde das zerkleinerte, bei 110° getrocknete Material im Soxhletschen Apparat erst mit Alkohol, dann mit Chloroform extrahiert, der Rückstand der Extrakte mit kaltem Äther aufgenommen und das Gewicht des ätherlöslichen Anteils bestimmt.

Wasserbestimmung.

	Gewicht vor dem Trocknen	Gewicht nach dem Trocknen	Wassergehalt %
Sagomilz	0,7182	0,133	81,5
„	0,2975	0,050	83,2
Schinkenmilz . . .	0,4045	0,074	81,8
Normale Milz . .	0,4055	0,070	82,7
„ „ . .	0,2532	0,045	82,1

---

[1]) So schreibt v. Schrötter (Biochemische Pathologie der Tuberkulose, 1903, S. 93): „Berücksichtigt man, daß die Leber bei amyloider Entartung um 2—3 kg an Gewicht zunehmen kann, welche Vermehrung wohl ausschließlich auf Kosten der infiltrierten Substanz kommt, so bedeutet dies nur für den bezüglich der Eiweißkörper wichtigen Stickstoff in den genannten Organen allein eine Bindung von ca. 350 g N, der dieserart inaktiviert wurde.“ Wenn man den Wassergehalt mit etwa 80 % ansetzt (v. Schrötter scheint ihn ganz vernachlässigt zu haben), entspricht obige Gewichtszunahme immerhin einer Fixation von 60 bis 90 g Stickstoff.

[2]) Journ. de Physiol. et de Pathol. générale 1902, 877.

Fettbestimmung.

	Gewicht g	Fett g	Fettgehalt %
Sagomilz	2,0074	0,2373	11,82
„	2,3588	0,2310	9,79
„	2,2747	0,2165	9,52
„	1,7619	0,2585	14,68
„	2,5430	0,1935	7,61
Normale Milz . . .	2,3860	0,2160	9,05
„ „ . . .	2,4190	0,2235	9,24

Eine ins Gewicht fallende Differenz im Wasser- und Fettgehalt scheint, soweit die geringe Zahl der untersuchten Fälle ein Urteil gestattet, zwischen normaler und Amyloidmilz nicht zu bestehen. Da auch die Menge eingelagerten Amyloids nicht zur Erklärung der Volumvergrößerung ausreicht, so ist dieselbe sicher zum Teil auf die Vermehrung anderer Gewebsbestandteile zu beziehen.

Bemerkenswert scheint mir endlich, daß weder Frerichs[1]), noch Oddi[2]) oder Czerny[3]) in amyloid degenerierter Leber oder Milz von Menschen Glykogen nachweisen konnten.

[1]) a. a. O.

[2]) a. a. O.

[3]) Arch. f. experim Pathol. u. Pharmakol. 81, 190, 1893.

Zur Kenntnis des Urochroms.

Erste Mitteilung.

Von

Hermann Hohlweg, Gießen.

(Arbeiten aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

(Eingegangen am 25. August 1908.)

Zur Darstellung des normalen Harnfarbstoffes, des Urochroms, hat man bisher recht verschiedene Methoden in Verwendung gezogen:

1. Man suchte ihn aus dem eingeengten Harn durch Lösungsmittel zu isolieren, wobei namentlich seine Löslichkeit in Alkohol und Unlöslichkeit in Äther in Betracht kam (Lehmann, Marcet u. a.). In relativ reinem Zustand, wenn auch unter großen Verlusten wurde er so von Garrod durch Ausziehen mit Alkohol nach vorgängigem Aussalzen mit Ammonsulfat erhalten.

2. Man fällte ihn unter verschiedenen Bedingungen mit Salzen von Schwermetallen (Kupfer, Blei, Quecksilber u. a.) und suchte ihn aus den Niederschlägen zu isolieren (Tichborne, Scherer, Schunck, Thudichum, Bondzynski, Dombrowski und Panek).

Da Harn leicht von Tierkohle entfärbt wird, habe ich versucht, den von der Kohle absorbierten Harnfarbstoff zu isolieren. Wie ich nachträglich fand, liegen auch nach dieser Richtung hin Vorversuche vor.

Kramm[1]), der im Anschluß an Garrod ein Verfahren zur Isolierung des Urochroms ausgearbeitet hatte, welches auf Aussalzen des Harnes mit Ammonsulfat und nachfolgendem

[1]) Deutsche med. Wochenschr. 1896, Nr. 2 und 3.

Ausschütteln mit Phenol beruht, teilt im Anschluß daran einige Beobachtungen mit, von denen er glaubt, daß sie sich eventuell zur Gewinnung einer Methode zur Reindarstellung des Farbstoffes verwerten ließen. Nach seiner Angabe wäre der Weg folgender: Bindung des Farbstoffes an Kohle durch Schütteln mit derselben, gründliches Auswaschen der auf das Filter gebrachten Kohle, zum mindesten bis zum Verschwinden der Chlorreaktion, Trocknen der Kohle im Vakuum, Behandlung mit einer wasserfreien gesättigten Phenolalkohollösung, in welche zwar gelbgefärbte Substanzen aus der Kohle, aber kein eigentlicher Harnfarbstoff hineingeht, so lange, bis diese Lösung nichts mehr aufnimmt; Behandlung mit wasserfreier gesättigter Phenolchloroformlösung. Aus dieser ist der Farbstoff durch Verdunsten des Chloroforms im Vakuum und Fällung mit Äther oder absolutem Alkohol zu gewinnen.

Kramm hat größere Farbstoffmengen auf diese Weise nicht hergestellt.

Bei Versuchen, die Menge des ausgeschiedenen Urochroms colorimetrisch zu bestimmen, hat später auch Klemperer[1]) von Tierkohle Gebrauch gemacht. Klemperer schüttelt Harn mit Tierkohle bis zur Entfärbung, wäscht mit Wasser gut aus (wobei Indican weggeht) und extrahiert die getrocknete Kohle mit Alkohol. Die aus solchen Extrakten dargestellte, nach Garrod gereinigte Substanz war eisenfrei und enthielt 4% Stickstoff.

Als Ausgangsmaterial meiner Versuche diente normaler Menschenharn. Dieser wurde mit Kalkmilch alkalisch gemacht, mit Chlorcalciumlösung völlig ausgefällt, das Filtrat mit Salzsäure neutralisiert und nun im Vakuum bei niederer Temperatur zum Sirup eingeengt. Nach Erkalten und Stehen wurde der flüssige Anteil von dem in großen Mengen auskrystallisierten Kochsalz getrennt, doch setzten sich bei weiterem mehrmonatlichen Stehen immer wieder Krystalle ab.

Für meine Versuche diente der dickflüssige, klare aber schwarzbraune Sirup. Er wurde zunächst mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und dann mit reiner, nicht allzu feinkörniger Tierkohle in der Schüttelmaschine mehrere Stunden

---

[1]) Berl. klin. Wochenschr. 1903, Nr. 14.

geschüttelt. Die Tierkohle wurde alsdann auf einem Filter gesammelt; die filtrierende Flüssigkeit war zunächst noch mehr oder minder intensiv gefärbt, wurde aber nach einer erneuten gleichen Behandlung mit frischer Tierkohle fast vollkommen farblos erhalten. Hierauf wurde die gesamte Kohle bis zum Verschwinden der Chlorreaktion mit heißem Wasser gewaschen. Dabei liefen nur die ersten Portionen noch gefärbt ab, während nachher das Wasser keine Spur von Farbstoff mehr aufnahm. Nach Trocknen der Kohle auf Tontellern bei 40° wurde dieselbe mit konzentriertem Eisessig — etwa mit $^1/_3$ bis der Hälfte des ursprünglich verwendeten Harnsirups — wieder einige Stunden in der Schüttelmaschine geschüttelt, wobei bereits nach einmaliger Wiederholung der Prozedur mit frischem Eisessig nahezu aller Farbstoff aus der Kohle extrahiert war.

Die Lösung zeigte eine intensiv dunkelbraune Färbung mit einem leichten Stich ins Rötliche; eine stärkere Konzentrierung ließ sich auch bei Extraktionsversuchen in der Wärme nicht erzielen. Aus der Eisessiglösung wurde danach der Farbstoff durch das 10fache Volumen Äther gefällt, wobei er sich im kleinen in schönen gelben Flocken, im großen dagegen als dunkelbraune harzige Masse abschied. Bei größeren Mengen war dabei eine vollständige Entfärbung des Äthers selbst bei Anwendung von einer mehr als 10fachen Menge Fällungsmittel nicht zu erreichen. Der auf einem kleinen Filter gesammelte harzige Körper erstarrte über Nacht vollkommen und ließ sich nach zweimal 24stündigem Trocknen bei 40° in der Reibschale zu einem feinen braunen Pulver verarbeiten.

Zu einer Substanz von gleichem Aussehen und auch gleichem chemischem Verhalten gelangte ich bei der Verarbeitung einer anderen Probe der Eisessiglösung des Farbstoffes durch Abdestillieren des Eisessigs im Vakuum bei einer Wasserbadtemperatur von 23°. Der hierbei erhaltene Rückstand wurde zur möglichsten Entfernung des anhaftenden Eisessigs noch mehrmals mit Äther behandelt und führte dann gleichfalls nach dem Trocknen zu einem pulverisierbaren braunen Körper.

Abgesehen von der Billigkeit hat letzteres Verfahren noch den Vorzug, daß es mit kaum nennenswerten Verlusten verbunden ist. Wie gesagt, verhielt sich das auf diesem Weg

gewonnene Produkt mit dem durch Ätherfällung erhaltenen vollkommen gleich.

Von anderen Mitteln zur Extraktion des Farbstoffes aus der Kohle hatte sich noch Methylalkohol als brauchbar erwiesen; doch ließen sich damit nicht entfernt so starke Konzentrationen an Farbstoff erzielen wie mit Eisessig.

Es sei hier ausdrücklich betont, daß selbst nach 10 Minuten langem Kochen der verwendeten Tierkohle mit konzentriertem Eisessig dieser beim Verdunsten auf dem Wasserbad keinen irgend nennenswerten, speziell keinerlei gefärbten Rückstand hinterließ.

Um eine ungefähre Vorstellung über die auf diesem Wege gewinnbaren Farbstoffmengen zu geben, sei bemerkt, daß aus 500 ccm des eingedampften Harns, entsprechend etwa 25 Liter gewöhnlichen Harns, 3,1 g trockene Substanz erhalten wurden.

Die über Schwefelsäure im Vakuum getrocknete Substanz zeigte nachstehendes Verhalten:

Sie verbrennt auf dem Platinblech unter reichlicher Abscheidung von Kohle und läßt dabei den charakteristischen Harngeruch erkennen. Die Asche gibt starke Eisenreaktion, deutlichen Calciumgehalt, kein Chlor. Beim Schmelzen mit schwefelsäurefreiem Ätzkali und Kaliumnitrat konnte weder Schwefel noch Phosphor nachgewiesen werden. Der Aschengehalt betrug 8,22 %.

Das Pulver ist leicht löslich in Wasser und Eisessig, noch ziemlich reichlich in Methylalkohol und verdünntem Äthylalkohol, unlöslich in absolutem Alkohol, Amylalkohol, Aceton, Benzol, Chloroform, Ligorin, Äther und Essigäther; diese Befunde decken sich also vollkommen mit den Angaben von Garrod und den neueren von Kramm.

Die wässerige Lösung hat deutliche Harnfarbe; sie zeigt keinen Absorptionsstreifen im Spektrum. Ausdrücklich soll auch hervorgehoben werden, daß nach Zusatz von ammoniakalischer Chlorzinklösung keine Urobilinreaktion beobachtet wurde.

Auch in seinem Verhalten gegen Metallsalze stimmt es mit den Angaben von Garrod[1]) und Bondzynski, Dom-

[1]) citiert nach Huppert-Neubauer.

browski und Panek[1]) nahezu vollkommen überein. Der Farbstoff wird aus seiner Lösung ausgefällt durch Zusatz von Silbernitrat als rotbrauner, durch Quecksilberacetat als gelber Niederschlag, wobei beidemale die Entfärbung der überstehenden Flüssigkeit eine vollständige ist. Nicht so vollständig ist dieselbe bei Fällung mit Phosphorwolfram- und Phosphormolybdänsäure, Kupferacetat und bei Anwendung von Bleiessig.

Ebenso erhielt ich entsprechend Garrods Beobachtung nach kurzer Behandlung der Farbstofflösung mit reinem Acetaldehyd in der Wärme und nachherigem Zusatz von ammoniakalischer Chlorzinklösung zwar nicht sofort, aber nach 48stündigem Stehen an der Luft eine außerordentlich deutliche grüne Fluorescenz. Im Spektrum trat allerdings kein für das Urobilin charakteristischer Absorptionsstreifen im Blau, sondern nur eine diffuse Absorption vom stärker gebrochenen Ende des Spektrums her auf.[2])

Die Substanz gab ferner eine sehr deutliche Molischsche Reaktion mit α-Naphthol — intensiv roter bis leicht violetter Ring an der Grenze der Schwefelsäureschicht — und eine außerordentlich starke Fichtenspanreaktion.

Die Analyse des Rohproduktes ergab:
47,58 % C; 6,30 % H; 9,89 % N, woraus sich das Verhältnis von C:H:N zu 5,62: 8.86: 1 berechnet.

0,2222 g Substanz = 0,3878 g CO_2 und 0,1251 g H_2O,
0,2012 g Substanz = 17,39 ccm N bei 19,5° und 757 mm Druck.
Asche 8,22 %.

Ein Versuch durch Einwirkung von Jodwasserstoff und Jodphosphonium nach Nencki und Zaleski[3]), aus dem Rohprodukt Hämopyrrol zu erhalten, führte zu keinem positiven Ergebnis.

Die mitgeteilten Versuche wurden im Sommersemester 1907 ausgeführt. Ein halbes Jahr darauf erschien die aus-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 46, 83.

[2]) Der verwendete Aldehyd war aus Paraldehyd unter Zusatz einiger Tropfen konzentrierter Schwefelsäure auf dem Wasserbad überdestilliert und in einem eisgekühlten Kölbchen aufgefangen worden. Kontrollproben des Aldehyds mit Ammoniak und Chlorzink gaben ebensowenig Fluorescenz, wie es die Farbstofflösung ohne vorausgegangene Behandlung mit dem Aldehyd getan hatte.

[3]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 34, 997, 1901.

führliche Untersuchung von St. Dombrowski: „Über die chemische Natur des spezifischen Farbstoffes des Harnes"[1]), in welcher verschiedene Verfahren zur Darstellung des Urochroms mit Hilfe der Kupferfällung beschrieben, zahlreiche Analysen von Urochrom selbst und Urochromsalzen mitgeteilt werden, und überdies durch eingehendere Versuche wahrscheinlich gemacht wird, daß das betreffende Produkt beim Erhitzen mit Zinkstaub oder Kalkhydrat gewöhnliches Pyrrol liefert. Obgleich zwischen dem von mir und dem von Dombrowski dargestellten Rohprodukt insofern ein großer Unterschied besteht, als ich mein gereinigtes Präparat schwefelfrei gefunden habe, während Dombrowski darin bis über 5 % Schwefel findet, so besteht doch im übrigen genügende Übereinstimmung, um die Annahme zu gestatten, daß das nach meinem Verfahren erhältliche Rohurochrom der Hauptmenge nach aus demselben Pyrrolderivat besteht wie das von Dombrowski mit Hilfe der Kupfermethode dargestellte.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 54, 188.

Zur Kenntnis des Urochroms.

Zweite Mitteilung.

Von

K. E. Salomonsen, Kopenhagen.

(Arbeiten aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

(Eingegangen am 25. August 1908.)

Auf Wunsch von Prof. Hofmeister habe ich die von Hohlweg begonnene Untersuchung (s. die vorhergehende Mitteilung) des Urochroms weitergeführt. Aus äußeren Gründen habe ich sie vorzeitig abgebrochen. Doch dürften einige Befunde, wegen ihrer Beziehung zu weiteren Versuchen einen kurzen Bericht wert sein.

Die Gewinnung des Rohurochroms geschah nach Hohlwegs Verfahren. Doch wurde das Schütteln mit Tierkohle in der Weise umgangen, daß der eingeengte Harn durch in ca. 5 cm breiten und 50 cm langen Glasröhren befindliche Tierkohle in langsamem Strome filtrierte. Zu diesem Zweck war eine Einrichtung getroffen, daß der Harn nur tropfenweise abfloß. Wenn die Tierkohle mit Farbstoff gesättigt war, wurde sie in den Röhren selbst chlorfrei gewaschen, dann herausgenommen, getrocknet, neuerdings in die Röhren gefüllt und nun in ähnlicher Weise durch einen langsamen Strom von Eisessig extrahiert. Der strohgelb bis braunrot gefärbte Auszug wurde im Vakuum bei 35° bis 40° eingeengt und der dickflüssige Rückstand mit dem etwa 10fachen Volumen Äther gefällt. Der Niederschlag zeigte das von Hohlweg beschriebene Verhalten. Doch enthielt er noch reichlich mit alkalischer Bleioxydlösung abspaltbaren Schwefel. Er enthielt reichlich Eisen, das durch wiederholtes Lösen in Alkohol und Fällen mit Äther nicht zu beseitigen war.

Zur Reinigung wurde die Substanz in das Kalksalz übergeführt.

Etwa 1 g des Rohprodukts wurde in möglichst wenig Wasser gelöst mit Kalkwasser bis zu deutlich alkalischer Reaktion versetzt, mit Kohlensäure der Kalküberschuß beseitigt, das Filtrat bei 40° in flachen Schalen zur Trockene gebracht. Der Rückstand löste sich bis auf einen geringen Rest in Wasser; die filtrierte Lösung wurde in absoluten Alkohol einfließen gelassen, der entstandene Niederschlag mit Alkohol durch Dekantation gewaschen, dann in der Zentrifuge zum Absetzen gebracht, mit Äther gewaschen und getrocknet.

Die im Vakuum über Schwefelsäure getrocknete Substanz stellte eine grauweiße bröckliche Masse dar.

0,1848 g gaben 0,2737 CO_2 und 0,0801 g H_2O,
0,1605 g gaben 12,40 ccm N bei 17,1° 763,8 mm Druck,
0,2140 g gaben stark geglüht 0,0310 g Asche, darin, wie durch eine spezielle Bestimmung ermittelt wurde, 0,0206 g CaO.

Die Substanz enthielt sonach: C = 40,39 %
H = 4,85 „
N = 9,02 „
Ca = 6,88 „
Sonstige Asche = 4,86 „

Das Verhältnis C : N ergibt sich daraus zu 5,23.

Bromprodukt.

Die bisher beschriebenen Präparate des Urochroms waren alle amorph und ohne Doppelbrechungsvermögen. Bei der Suche nach einem besser charakterisierten und für weitere Reinigung geeigneteren Derivat glückte es, ein solches in einem Bromprodukt aufzufinden, das durch seine schön körnige Beschaffenheit und sein Doppelbrechungsvermögen von vorneherein als reinere Substanz erschien.

Rohurochrom wurde in Wasser gelöst und tropfenwesie mit überschüssigem Brom versetzt. Es entstand ein gelber Niederschlag, der sich beim Stehen in der Kälte als zähflüssige dunkelbraune Masse absetzte. Wurde die überstehende Flüssigkeit nach 3 bis 4 Stunden abgegossen, der Niederschlag in der Reibschale mit Wasser verrieben, so wandelte es sich in eine dottergelbe pulverige Masse um, die in Wasser nur in der Hitze schwer löslich war, sich in absolutem, bis 80 %igem Alkohol nur wenig, besser in 60 %igem Alkohol, leicht in Eisessig löste.

Mit Alkalien ging die Substanz glatt in Lösung und wurde durch Neutralisation mit Säure aus konzentrierter Lösung zum Teil in Form eines braunen amorphen Niederschlages gefällt. Die Lösung des Ammoniaksalzes wurde nicht durch Calcium-, Magnesium- und Bariumsalze gefällt, wohl aber durch Kupferacetat, neutrales Bleiacetat, Silbernitrat und Mercurinitrat.

Die Lösung in Eisessig konnte mit Äther gefällt werden, doch hatte die gefällte Substanz nicht mehr die schön gelbe körnige Beschaffenheit, sondern war, ähnlich dem durch Säure fällbaren Produkt, graubraun und amorph. Der zur Fällung benutzte Äther war braun und enthielt reichlich Brom. Das ursprüngliche Bromprodukt gibt sonach leicht einen Teil seines Broms an Lösungsmittel ab.

Wird Rohurochrom mit Brom erwärmt, so tritt weitgehende Bromierung und Oxydation ein. Der ursprünglich vorhandene gelbe Niederschlag geht in Lösung. Nach Einengen einer solchen Probe und Vertreiben des Broms konnte die Anwesenheit einer wasserunlöslichen öligen gefärbten Säure nachgewiesen werden. Daneben fanden sich farblose ätherlösliche Krystalle und merkliche Mengen Schwefelsäure.

Bei Erhitzen mit Zinkstaub oder mit Kalkhydrat gab das Bromprodukt ebenso schöne Fichtenspanreaktion wie die Muttersubstanz.

Bei der Zersetzlichkeit des genuinen Urochroms war es erwünscht, festzustellen, ob das von Hohlweg und von mir dargestellte Präparat, das aus bei niederer Temperatur eingedampftem Harn gewonnen war, nicht bereits einem Umwandlungsprodukt entspricht. Es wurde daher eine große Menge frischen normalen eiweißfreien Harns durch Tierkohle geschickt, die Kohle dann im übrigen wie oben behandelt. Das erhaltene Rohprodukt zeigte durchaus gleiches Verhalten, gab höchst intensive Pyrrolreaktion, fiel mit Kupferacetat und lieferte mit Brom den beschriebenen Bromkörper.

Zur Kenntnis des Urochroms.

Dritte Mitteilung

Von

Stefano Mancini, Siena.

(Arbeiten aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

(Eingegangen am 25. August 1908.)

Durch die Darstellung eines körnigen doppeltbrechenden Bromproduktes aus Rohurochrom (vgl. die vorgängige Untersuchung von Salomonsen) schien ein aussichtsvoller Weg zur Charakterisierung des Urochroms gegeben. Ich habe daher auf Veranlassung von Prof. Hofmeister dieses Bromprodukt genauer untersucht.

Die Darstellung geschah im ganzen auf dem von Hohlweg und Salomonsen angegebenen Wege, doch konnte sie mehrfach vereinfacht werden. Auf Grund der von Salomonsen gemachten Erfahrungen wurde meist von nicht eingedampftem Harne ausgegangen.

Etwa 200 l Harn werden mit einer ammoniakalischen Lösung von Barium- und Calciumacetat ausgefällt, das Filtrat mit Kohlensäure von überschüssigem Baryt befreit, dann, schwach angesäuert, durch eine hohe Schicht Tierkohle filtriert. Nach Sättigung der Kohle mit Farbstoff wird sie bei 50° getrocknet, dann mit Eisessig bis zur Erschöpfung ausgezogen. (Die Behandlung mit Baryt- und Kalksalz ist weniger zur Entfernung der Sulfate und Phosphate als zur völigen Klärung des Harns notwendig. Sie verhindert, daß geformte Bestandteile in die Tierkohle übergehen. Das Auswaschen der Tierkohle bis zur Chlorfreiheit erwies sich als überflüssig, da die spätere Behandlung zur Entfernung des anhaftenden Kochsalzes und anderer leichtlöslicher Beimengungen hinreichte.)

Der Eisessigextrakt wurde im Vakuum bei 40° auf ein Zehntel eingeengt, vom auskrystallisierten Kochsalz abfiltriert, neuerdings dann mit Wasser verdünnt und im Vakuum bei 40° bis zum Sirup eingedampft.

Die nahezu vollständige Entfernung des Eisessigs erwies sich als nötig, weil er die Ausfällung des Bromproduktes in sehr merklicher Weise behindert.

Der sirupöse Rückstand wurde in möglichst wenig Wasser gelöst, filtriert und das braune Filtrat bei niedriger Temperatur am besten unter Eiskühlung mit überschüssigem Brom versetzt. Es fällt ein Niederschlag aus, der sich am Boden des Gefäßes in Form eines dichten, braunroten Sirups sammelt. Nach einigem Stehen auf Eis wird dekantiert und der Bodensatz mit destilliertem Wasser gewaschen. Dabei verwandelt er sich unter Abgabe von überschüssigem Brom in eine gelbe, breiartige Masse, die sich leicht mit Wasser auswaschen und abfiltrieren läßt.

Zur weiteren Reinigung wird das Rohprodukt in Lauge gelöst, die Lösung filtriert und in möglichst konzentrierter Lösung leicht angesäuert. Der ausfallende braune körnige Niederschlag wird in Wasser gelöst und die gesamte Lösung neuerlich mit Brom behandelt. Nach nochmaliger Wiederholung der Brombehandlung wird der körnige, schön gelbe Niederschlag in der Reibschale reichlich mit Wasser gewaschen, dann abfiltriert über Kali und dann über Schwefelsäure getrocknet.

Die reine bromierte Substanz ist doppeltbrechend von hell- bis dottergelber Farbe, löslich in heißem Wasser, etwas löslich in absolutem Alkohol, unlöslich in Äther, Chloroform, Amylalkohol, Phenol und Benzol. Alkalien lösen zu brauner Lösung, aus der Essigsäure bei genügender Konzentration einen braunen Niederschlag fällt. Die möglichst wenig Alkali enthaltende Lösung fällt mit Kupferacetat, Kupfersulfat, Eisenchlorid, neutralem Bleiacetat. Beim Erhitzen mit Zinkstaub oder mit Kalkhydrat geben die geringsten Mengen sehr starke Pyrrolreaktion. Sie enthält nach wiederholter Fällung mit Brom keinen Schwefel und ist dann nahezu oder ganz aschefrei.

Präp. 1.	0,1124 g	Substanz	gaben	0,1464 g CO_2 und 0,0353 g H_2O,
	0,0394 „	„	„	0,0352 „ AgBr,
Präp. 2.	0,1092 „	„	„	0,1390 „ CO_2 und 0,0370 g H_2O,
	0,0955 „	„	„	7,1 ccm N bei 18° und 722 mm,
	0,1050 „	„	„	0,0946 g AgBr,
Präp. 3.	0,1198 „	„	„	8,8 ccm N bei 20° und 723 mm.

	I	II	III	Mittel
C	35,53	34,71	—	35,12
H	3,81	3,79	—	3,80
Br	38,02	38,34	—	38,18
N	—	8,17	8,03	8,10
O	—	—	—	14,80

Präparate des Bromprodukts, welche durch einmalige Bromeinwirkung bei Zimmertemperatur dargestellt waren, enthielten weniger

Stickstoff, was sich aus der Beimengung von etwas Bromanil (s. unten) erklärt. Auch zeigten solche nicht genügend gereinigte Präparate eine mehr orangegelbe Farbe und enthielten wechselnde Mengen Schwefel und Asche.

Es wäre verfrüht, aus den obigen Analysenzahlen die endgültige Formel ableiten zu wollen. Immerhin ist zum Behufe des Vergleichs mit älteren und künftigen Befunden eine zahlenmäßige Betrachtung am Platze.

Das Verhältnis von Kohlenstoff- zu Stickstoffatomen ergibt sich aus obigem zu 5,07 C : 1 N. Dieses Verhältnis nähert sich dem von Salomonsen gefundenen C : N — Verhältnis 5,23 und dem von Thudichum für Uromelanin ermittelten 5,14. Gegenüber den von Dombrowski für sein Urochrom gefundenen Zahlen, aus denen sich dieses Verhältnis von 4,3 bis 6,0 berechnet, stellt dieser Befund einen mittleren Wert dar.

Dieses Verhältnis entspricht sehr annähernd einem Gehalt von 36 Kohlenstoffatomen auf 7 Stickstoffatome, und es läßt sich die Zusammensetzung des untersuchten Bromprodukts unter Berücksichtigung des Umstandes, daß die Wasserstoffzahlen und Stickstoffzahlen meist zu hoch gefunden werden, in erster Annäherung durch die Formel $C_{36}H_{41}Br_6N_7O_{12}$ ausdrücken.

	Berechnet: %	Gefunden im Mittel: %	Gefunden im Präparat II u. III: %
C	34,75	35,12	34,71
H	3,32	3,50	3,79
Br	38,58	38,18	38,34
N	7,90	8,10	8,10
O	15,45	14,80	15,06

Nach den Erfahrungen älterer Autoren[1]) wird der normale Harnfarbstoff durch Einwirkung von Säuren in dunkelgefärbte, wasserunlösliche, harzartige Stoffe überführt, die mit verschiedenen Namen bezeichnet wurden. Einer davon, das durch Einwirkung von Schwefelsäure entstehende, in Alkali lösliche Uromelanin ist von Thudichum[2]) als amorpher Körper isoliert und als solcher sowie in Form einer ganzen Reihe von Salzen analysiert worden. Er gibt dem Uromelanin danach die Formel

[1]) Vgl. die ältere Literatur bei Dombrowski, Zeitschr. f. physiol. Chem. 57, 188.

[2]) Journ. f. prakt. Chem. 104, 257.

$C_{36}H_{43}N_7O_{10}$. Ersetzt man in oben gefundener Formel des Bromproduktes Brom durch Wasserstoff, so ergibt sich $C_{36}H_{47}N_7O_{12}$, welche Formel sich von jener des Uromelanins nur durch ein Plus von zwei Wassermolekülen unterscheidet.

Es wäre denkbar, daß das Uromelanin durch Säurewirkung aus jener Substanz, deren Bromprodukt der von mir untersuchte Körper ist, durch Säurewirkung in ähnlicher Weise hervorgeht, wie etwa Dyslysin aus Cholsäure.

Da es zweifelhaft ist, ob diese Substanz mit dem genuinen Urochrom identisch ist, so möchte ich sie, genauer gesagt den schwefelfreien pyrrolliefernden Körper, der dem isolierten Bromprodukte zugrunde liegt und der vermutlich die Zusammensetzung $C_{36}H_{47}N_7O_{12}$ hat, auf Vorschlag von Herrn Professor Hofmeister vorläufig als Uropyrryl bezeichnen. Das untersuchte Bromprodukt wäre danach ein bromiertes Uropyrryl, das Uromelanin ein Anhydrid desselben.

Durch Einwirkung von Brom in der Wärme hat Salomonsen (siehe die vorhergehende Mitteilung) aus Rohurochrom eine ölige Säure, einen krystallinischen Körper sowie Schwefelsäure erhalten. Es erschien notwendig, diese Produkte näher zu charakterisieren.

Von der möglicherweise irrigen Vorstellung ausgehend, daß der Bromkörper einfach ein gebromtes Urochrom ist, wurde die Oxydation nicht mit dem Rohurochrom, sondern mit dem ersten durch Brom erhaltenen Niederschlag — also dem nicht weiter gereinigten gebromten Uropyrryl vorgenommen.

Der Niederschlag wurde in Wasser verteilt, mit Brom im Überschuß versetzt und auf dem Wasserbade erwärmt. Nach einigen Minuten war ein großer Teil der Substanz in Lösung gegangen, während sich ein dunkel gefärbter bromreicher Sirup am Boden absetzte. Zur Oxydation dieses Anteils wurde die Brombehandlung vier Stunden lang fortgesetzt.

Nach vierundzwanzigstündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde die überstehende völlig klare gelbrote Flüssigkeit von Brom durch Erwärmen befreit und zu einem dünnen Sirup eingedampft. Bei Extraktion mit Äther gingen in diesen zwei Säuren über, von denen die eine in Wasser sehr leicht, die andere nur schwer löslich war. Durch Aufnehmen mit wenig Wasser und Verdunstenlassen wurde die wasserlösliche

Säure als aus Prismen bestehender Krystallbrei erhalten, der von noch anhaftender öliger Säure auf der Tonplatte getrennt wurde. Nach dem Umkrystallisieren erwies sich die Säure durch Reaktionen und Zusammensetzung als Oxalsäure.

0,1216 g Substanz gaben 0,0860 CO_2 und 0,0563 H_2O.

	Berechnet für $C_2H_2O_4 + 2H_2O$	Gefunden
	%	%
C	19,04	19,29
H	4,80	4,18

Die in Wasser schwer lösliche gelb gefärbte Säure wurde mit Ammoniak in Lösung gebracht, mit Chlorcalcium ausgefällt, das Filtrat mit Schwefelsäure angesäuert und neuerdings ausgeäthert. Der Äther hinterließ beim Eindunsten eine teerig-ölige Masse, die sich wenig in kaltem und heißem Wasser löste, reichlich hingegen in Alkohol und Äther. Die mit Ammoniak neutralisierte wässerige Lösung gab mit neutralem Bleiacetat und Kupferacetat amorphe Niederschläge, die sich beim Erhitzen zum Teil in Wasser lösten. Beim Einengen der mit Ammoniak hergestellten Lösung krystallisierte ein Teil des Sirups in Büscheln und Garben von gelb gefärbten Nadeln.

Die gereinigte ölige Säure, frei von Oxalsäure und Schwefel enthielt Brom und gab die Fichtenspanreaktion mit Zinkstaub, aber auch mit Kalkhydrat allein, in ausgesprochenster Weise.

Der bei der Bromierung als Sirup abgeschiedene wasserunlösliche Anteil, der anscheinend weiterer Oxydation hartnäckig widerstand, lieferte beim Versuch, ihn in Alkohol zu lösen, schöne goldgelbe Kryställchen, die nach Aussehn und Löslichkeitsverhältnissen als Bromanil angesprochen werden mußten.

Sie waren unlöslich in Wasser, schwerlöslich in Alkohol und Äther, gut löslich in Benzol und Eisessig. Aus letzteren Lösungsmitteln krystallisierte die Substanz in goldglänzenden rhombischen Tafeln oder Plättchen. Beim Erhitzen mit Kalihydrat gab sie eine sehr intensive purpurfarbige Lösung; die gelben Kryställchen enthielten vielfach eine schön rot gefärbte Substanz eingeschlossen.

Obgleich die Substanz, deren geringe Menge eine genügende Reinigung untunlich erscheinen ließ, einen niedrigeren Schmelzpunkt (260° statt 300°) und einen höheren Bromgehalt (80 statt

75,5 %) besaß, als dem Bromanil zukommt, ist doch an deren Identität damit kaum zu zweifeln.

Es waren somit bei der Bromierung neben einer öligen noch die Fichtenspanreaktion gebenden Säure, die wohl das Hauptprodukt darstellte, noch Oxalsäure und (höchstwahrscheinlich) Bromanil erhalten worden. Dazu kommt nach Salomonsen bei Bromierung des Rohurochroms noch Schwefelsäure.

Da ich den beschriebenen Abbauversuch mit Brom an dem nicht weiter gereinigten ersten Bromniederschlag ausgeführt hatte, der, wie mir sonst aufgestoßen ist, noch schwefelhaltig sein kann, so war die Frage zu entscheiden, ob die intensive Bromeinwirkung auch bei dem gereinigten bromierten Uropyrryl zu den gleichen Endprodukten führt.

Der mit einer geringen Menge (10 cg) reiner Substanz ausgeführte Versuch lieferte nur die oben beschriebene ölige Säure, die die Pyrrolreaktion gibt. Hingegen war weder Oxalsäure noch Bromanil aufzufinden, obgleich deren Nachweis sonst, selbst bei sehr geringen Mengen ohne Schwierigkeit gelingt. Der Versuch bedarf der Wiederholung. Doch ist vorläufig anzunehmen, daß diese Produkte aus im Rohurochrom enthaltenen Stoffen hervorgehen, welche zum Uropyrryl nicht direkt in Beziehung stehen.

Aus der endgültigen Entscheidung dieser Frage wird sich Näheres darüber ergeben, in welcher Beziehung das gebromte Uropyrryl zum ursprünglichen Urochrom steht. Durch die bisherigen Untersuchungen über das Urochrom ist dessen Natur nicht genügend festgestellt. Es ist denkbar, daß es dem Uropyrryl sehr nahe steht, zumal da das von Salomonsen dargestellte Calciumsalz bis auf den viel höheren Sauerstoffgehalt ein sehr ähnliches Atomverhältnis von C:N aufweist als das Uropyrryl. Auch die Frage, ob das Urochrom Schwefel enthält, ist durchaus nicht geklärt. Das von Hohlweg mit seiner Methode dargestellte Rohurochrom war diesem Autor zufolge nach wiederholter Reinigung schwefelfrei. Salomonsen fand darin wechselnde Mengen abspaltbaren Schwefels. Das von Dombrowski mit der Kupfermethode isolierte Urochrom, das, wie nebenbei erwähnt sei, nach meinen Versuchen bei Brombehandlung typisches gebromtes Uropyrryl liefert, enthielt, wie

aus den von Dombrowski mitgeteilten Analysen hervorgeht, stets Schwefel, aber in sehr ungleicher Menge. Falls dieser Schwefelgehalt in der Tat dem ursprünglichen Urochrom angehörte und nicht bloß einer Beimengung, so muß die entsprechende schwefelhaltige Gruppe außerordentlich leicht von dem die Pyrrolreaktion bedingenden Kern losgelöst werden können. Die Klarstellung dieser Verhältnisse ist zurzeit Gegenstand weiterer Untersuchungen im hiesigen Laboratorium. Besonderes Interesse verdient weiter die die Pyrrolreaktion gebende ölige Säure, die bei weitgehender Brombehandlung erhalten wurde. Ihre Untersuchung verspricht weitere Aufklärung über den Bau des Uropyrryls und damit des Urochroms zu liefern.

Beitrag zur Lehre vom Kreislaufe der Galle.

Von

Dr. Gustav Bayer, Assistent.

(Aus dem Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie der k. k. Universität Innsbruck.)

(Eingegangen am 23. Juli 1908.)

Mit 1 Tafel.

I. Die Schutzwirkung des Serums gegenüber der Giftwirkung der Galle.

Die für alle daraufhin untersuchten Zellen und Gewebe des tierischen Körpers so ungemein giftige Galle wird bekanntlich aus dem Darme teilweise wieder aufgesaugt und mit dem Blutstrome der Leber zugeführt und von deren Zellen aufgenommen, um neuerdings als Verdauungsflüssigkeit verwendet zu werden. Die Existenz dieses „enterohepatischen Gallenkreislaufes" ist zumindest für die Cholate mit Sicherheit festgestellt[1]) und auch für die Gallenpigmente liegen einzelne Angaben vor, welche ein Kreisen derselben wahrscheinlich zu machen suchen.

Die Menge der aus dem Darmkanal resorbierten Galle ist sehr groß und wird von Bidder und Schmidt[2]) und von Hoppe-Seyler[3]) übereinstimmend auf $^7/_8$ der in das Duodenum entleerten Gallenquantität geschätzt. Dieses haushälterische Verfahren des Organismus ist zwar einerseits begreiflich, da ja doch sehr große Mengen von Galle für die

---

[1]) Die diesbezügliche Literatur vgl. bei Stadelmann, Der Ikterus und seine verschiedenen Formen. Stuttgart 1891, 95ff. — Weintraud, Nagels Handbuch der Physiologie 2 (2), 514 bis 515.

[2]) Bidder und Schmidt, Mitau u. Leipzig 1852, 218.

[3]) Hoppe-Seyler, Arch. f. pathol. Anat. 26, 535, 1863.

Fettverdauung erforderlich sind und da ein eigentlicher Verbrauch derselben bei ihrer vorwiegenden Funktion als „Aktivator“ für das fettspaltende Pankreasferment[1]) und als „Lösungsmittel[2]) nicht anzunehmen ist.

Andererseits aber bietet die geradezu enorme Giftigkeit der Galle, die, wie zahlreiche Experimentaluntersuchungen lehren, vorwiegend durch die gallensauren Salze bedingt ist, dem Verständnisse der Lehre vom Gallenkreislaufe einige Schwierigkeit. Wenn auch nach Heidenhains[3]) Berechnung im Blute nur 0,024 % Gallensäure enthalten sein müssen, um die ganze 24stündige Ausscheidung an Cholaten zu decken, so liegt doch diese Konzentration nicht allzuweit entfernt von derjenigen, bei welcher bereits eine beträchtliche Lösung von roten Blutkörperchen erfolgt.[4]) Ganglienzellen dürften, wie sich mir aus mehreren Versuchen ergeben hat, noch eine weit größere Empfindlichkeit gegenüber der Giftwirkung der Galle besitzen als die Erythrocyten.[5]) Ferner ist zu bedenken, daß die von Heidenhain berechnete Konzentration sicherlich keinen Maximalwert darstellt und schon physiologischerweise auf der Höhe der Fettresorption, vornehmlich aber bei pathologischen Geschehnissen, speziell beim Ikterus, wenigstens vorübergehend wesentlich höhere Werte annehmen wird.

Hieraus erhellt die Notwendigkeit einer Schutzmaßregel für den Organismus, durch welche er gegen die Gefahren einer Giftwirkung seitens der Cholate gefeit ist. Einen solchen Schutz bietet nun — zunächst allerdings nur für die Form-

[1]) O. v. Fürth und J. Schütz, Über den Einfluß der Galle auf die fett- und eiweißspaltenden Fermente des Pankreas, Beiträge z. chem. Physiol u. Pathol. 9, 29, 1907.

[2]) Vgl. B. Moore und W. H. Parker, On the function of the bile as a solvent, Proc. Roy. Soc. 68, 443, 64, 1900.

[3]) Heidenhain, Physiologie der Absonderungsvorgänge, in Hermanns Handb. d. Physiol. 5, 232.

[4]) Dieselbe ist nach Rywosch, Arbeiten aus dem pharmak. Institut zu Dorpat 1 (2), 111, 1888: 0,061 %; meinen eigenen Versuchen zufolge wesentlich niedriger, etwa 0,04 %; der Unterschied erklärt sich dadurch, daß Rywosch verdünntes Gesamtblut, ich aber serumfrei gewaschene Erythrocyten verwendete.

[5]) Galle-Serumgemische, die Kaninchenblutkörperchen gegenüber inaktiv sind, rufen, durch die Carotis einem Kaninchen hirnwärts injiziert, häufig noch deutliche nervöse Reizungserscheinungen hervor.

elemente des Blutes, die antihämolytische Wirkung des Blutserums. Es genügen bekanntlich schon sehr geringe Mengen von Serum, um die Blutkörperchen zerstörende Fähigkeit der Cholate zu paralysieren.[1])

Die Kenntnis dieser antilytischen Serumfunktion ist für das Verständnis der Tatsache, daß auch bei hochgradigem Ikterus eine Zerstörung von Erythrocyten wahrscheinlich gar nicht oder, wenn schon überhaupt, so doch nur im geringsten Ausmaße stattfindet,[2]) von Bedeutung.

Auf Grund naheliegender Überlegungen erhob sich die Frage, ob sich die entgiftende Wirkung des Serums denn nur gegenüber der hämolytischen Kraft der Cholate äußere, oder nicht auch gegen die übrigen Giftwirkungen der Gallensalze zur Geltung komme, weshalb einige Versuche nach dieser Richtung hin ausgeführt wurden, deren Ergebnis hier in Kürze mitgeteilt werden soll.

In den im folgenden angeführten Versuchen wurde der Einfluß von Serum auf die Giftwirkungen, welche die Cholate gegen Leukocyten, quergestreifte Muskel, das Herz und das Nervensystem ausüben, geprüft.

Leukocyten: Die Giftwirkung der Galle gegen dieselben[3]) gibt sich durch eine rasch eintretende Lähmung der amoeboiden Bewegungen und darauffolgendes Zerfließen des Zellinhaltes kund.

In den hier mitzuteilenden Versuchen wurden die Leukocyten einer 15stündigen Aleuronat-Peritonitis vom Meerschweinchen verwendet. Es wurden zwei Gallenlösungen in bezug auf ihre Giftigkeit miteinander verglichen, von welchen die eine — Lösung A —

aus 3 ccm $1^0/_0$iger Natriumglykocholatlösung + 4 ccm physiol. Kochsalzlösung;

die andere — Lösung B —

---

[1]) Vgl. H. Lüdke, Centralbl. f. Bakteriol. u. Parasitenk., Abt. I, Orig., 42, Nr. 5, 455 bis 462, u. Nr. 6, 552 bis 561, 1906.

[2]) Ausführliches hierüber bei Weintraut, Krankheiten der Leber, Handb. d. Pathol. d. Stoffwechsels von C. v. Noorden 1, 776 u. 778, 1906.

[3]) Zuerst beobachtet von v. Dusch, Untersuchungen und Experimente als Beitrag zur Pathogenese des Ikterus und der akuten gelben Atrophie der Leber. Habilitationsschrift 1854. — Vgl. auch Jurasz, Inaug.-Dissert. Greifswald 1871.

aus 3 ccm 1%iger Natriumglykocholatlösung + 4 ccm Kaninchenserum

bestand. Zu je 1 ccm dieser Lösungen wurde 1 ccm des leukocytenreichen Peritonealexsudates hinzugefügt. Nach 1 Stunde (Temperatur 37° C) waren bei dem kein Kaninchenserum enthaltenden Gemisch A alle weißen Blutzellen zerfallen, während in Lösung B die Eiterkörperchen auch nach 3 Stunden keine sichtbare Schädigung erlitten hatten.

Muskel[1]: Die beiden Gastroknemii einer Rana temporaria werden in gleiche Gallensalzmengen enthaltende Lösungen, von welchen die eine mit physiologischer Kochsalzlösung, die andere mit Kaninchenserum hergestellt ist, eingetaucht und ihre Zuckungen auf gleiche elektrische Reize (Öffnungsschläge) mittels Muskelhebels auf einer Kymographiontrommel verzeichnet. Das sehr eklatante Resultat eines solchen Versuches zeigt Fig. 1 auf Tafel II. Die obere Zuckungsreihe zeigt das rasche Absinken der Zuckungshöhe des in die serumfreie Gallensalzlösung eingetauchten Muskels, die untere die Paralysierung dieses toxischen Effektes durch Serum.

Wirkung auf das Zentralnervensystem und die Zirkulation: Während die meisten Autoren die depressive Wirkung der Galle konstatieren, beobachteten v. Dusch[2], Röhrig[3], v. Leyden[4], Loewit[5] und neuerdings auch Meltzer und Salant[6] gelegentlich Krämpfe der Körpermuskulatur als Folge von intravasalen Gallensalzinjektionen; auf Grund eigener Erfahrungen muß ich mich der Ansicht der eben genannten Autoren anschließen. Auch ich beobachtete — besonders nach hirnwärts gerichteten Injektionen durch die Carotis — bei Kaninchen recht häufig das Auftreten konvulsivischer Zustände. Wurde nach einer solchen, Krämpfe er-

---

[1] Giftwirkungen der Galle auf den Muskel zuerst beschrieben von J. Budge, Spezielle Physiologie des Menschen. 1857, 108 u. 255, u. W. Kühne, Reicherts u. Du Bois-Reymonds Arch. 1859, 23ff.

[2] l. c. 22.

[3] Röhrig, Arch. f. Heilk. 1863.

[4] v. Leyden, Beiträge zur Pathologie des Ikterus. Berlin 1866, 65 u. 66, 96.

[5] M. Loewit, Zeitschr. f. Heilk. 2, 459ff.

[6] Meltzer und Salant, Studies on the toxicity of bile II, Journ. of experim. med. 1906.

zeugenden Injektion eine zweite, die gleiche Gallensalzmenge enthaltende Lösung in Kaninchenserum eingespritzt, so blieben die Konvulsionen entweder ganz aus oder zeigten weitaus leichteren Charakter, woraus zu schließen sein dürfte, daß die zentralen Reizwirkungen der Galle ebenso wie die vorher besprochenen Giftwirkungen durch Serum aufgehoben oder doch sehr stark abgeschwächt werden. Hierdurch erklärt sich auch, warum Krämpfe, die bei intravasaler Injektion verhältnismäßig so selten auftreten, bei subduraler Applikation stets gesehen werden;[1]) die geringen Eiweißmengen des Liquor cerebrospinalis[2]) genügen eben zur Entgiftung nicht.

Auch in bezug auf die Beeinflussung der Atmung muß dem Serum eine die Giftwirkung der Gallensalze paralysierende Wirksamkeit zugesprochen werden.

Das zu den diesbezüglichen Versuchen verwendete Natrium glycocholicum Merck wirkt in quantitativer und qualitativer Beziehung anders als die von früheren Autoren untersuchten Präparate. Zwar trat auch in meinen Versuchen, die alle an Kaninchen angestellt worden waren, bei hirnwärts gerichteten Injektionen häufig Verminderung der Atemfrequenz auf, jedoch war diese meist nur geringfügig im Vergleiche mit den von Traube[3]) und von Loewit[4]) erzielten Effekten. Auch die übrigen bisher beschriebenen Veränderungen der Atmung (Stillstand der Atmung bei Mittellage des Zwerchfells, Attacken von ungemein rascher und vertiefter Atmung, Stillstand der Atmung in Inspiration mit einzelnen stoßweisen exspiratorischen Atembewegungen), bekam ich in meinen Versuchen gelegentlich zu Gesicht, jedoch waren die zu ihrer Erzielung notwendigen Cholatmengen weitaus größer als in Loewits Versuchen. Auch in qualitativer Beziehung unterschied sich die Wirkung meines Präparates von der der bisher verwendeten besonders dadurch, daß bei meinen Versuchen in der Regel intensive und anhaltende

---

[1]) Bickel, Münch. med. Wochenschr. 1897, Nr. 21. — Bidl und Kraus, Centralbl. f. klin. Med. 1898, 1185ff.

[2]) Nach E. Nawratzki, Zeitschr. f. physiol. Chem. 23, 532ff., 1897, beträgt der Eiweißgehalt des Liquor cerebrospinalis 0,0221 $^0/_0$.

[3]) L. Traube, Über den Einfluß der gallensauren Salze auf die Herztätigkeit. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 1, 378, 1864.

[4]) Loewit, l. c. S. 482ff.

Dyspnoe ohne Atempause auftrat, eine Veränderung, die von anderen Untersuchern nur sehr selten beobachtet worden war. (Loewit, bei Versuchen an Hunden.) Die Erklärung für diese Differenzen dürfte in der Beschaffenheit des Präparates zu suchen sein.

Immerhin zeigte sich die entgiftende Wirkung des Serums auf die gegen die Atmung gerichtete Giftwirkung in meinen zahlreichen Versuchen stets in deutlichster Weise. (S. Fig. 2 und 3 auf Tafel II.)

Ebenso wird auch der Eintritt der Kreislaufstörungen, die im wesentlichen mit dem hierüber Bekannten übereinstimmen und auf deren Analyse deshalb nicht eingegangen werden soll, wie sich aus Fig. 2, 3 und 4 der beigegebenen Tafel ergibt, durch Zusatz von Serum ganz (Fig. 2 und 4) oder teilweise (Fig. 3, bis auf die infolge der Injektion auftretenden Unregelmäßigkeiten der Herzaktion) hintangehalten. Bezüglich der Technik dieser Versuche sei auf Loewits[1]) Abhandlung hingewiesen.

Es ergibt sich aus diesen mehrfach mit dem gleichen Resultate wiederholten Versuchen, daß den vorhin ausgesprochenen Vermutungen entsprechend die Entgiftung der Galle durch das Blutserum sich nicht nur in bezug auf die hämolytische, sondern auch hinsichtlich der übrigen toxischen Cholatwirkungen geltend macht.[2]) Diese Aufhebung der Giftwirkungen der Gallensalze, die vielleicht schon unter physiologischen, sicherlich aber unter pathologischen Bedingungen für den Organismus von der größten Bedeutung ist, darf wohl, wie kürzlich für die antihämolytische Serumfunktion nachgewiesen werden konnte,[3]) auf eine zwischen den Eiweißkörpern des Serums und den Cholaten stattfindende Bindung bezogen werden. Auch nach Neumeister[4]) besitzen die gallensauren Salze die Fähigkeit, sich Proteinstoffen in eigentümlicher Weise innig anzulagern.[5])

[1]) l. c.

[2]) Vgl. hierzu S. Flexner (Journ. of experim. med. 8, 1906), der entdeckte, daß die Pankreatitis erzeugende Wirkung der Cholate durch Kolloide aufgehoben wird.

[3]) Diese Zeitschr. 5, 368, 1907, und Fenyvessy, ebenda 5, 114, 1907.

[4]) Neumeister, Lehrb. d. physiol. Chem. 1893, I. Teil, S. 177.

[5]) Neumeister weist an dieser Stelle auch auf die mögliche bio-

Welcher Art diese Bindung sei, ist bisher nicht untersucht, doch erscheint es in hohem Maße wahrscheinlich, daß es sich um eine jener physikalisch-adsorptiven Kuppelungen handle, für welche durch die von Quinke geschaffene Bezeichnung der „kolloidalen Umhüllung" ein so charakteristischer Ausdruck geprägt worden ist. Solche kolloide Bindungen erfolgen, wie besonders auch von Landsteiner[1]) und seinen Schülern wiederholt konstatiert wurde, häufig energischer, wenn das bindende oder das umhüllende Kolloid vorher erhitzt worden war. Da auch, wie aus Tabelle I ersichtlich ist, vorher erwärmtes Serum im höheren Maße zur Neutralisierung der hämolytischen Wirkung geeignet ist als unerhitztes, so dürfte durch diesen Umstand die Annahme, daß die Eiweiß-Cholatbindung als adsorptive aufzufassen ist, eine Stütze erhalten.

Tabelle I.

Jedes Röhrchen enthält 0,3 ccm einer 1 %igen Lösung von taurocholsaurem Natrium und 1 ccm 5 %iger Erythrocyten-Emulsion (Meerschweinchen) f. MS = frisches Meerschweinchenserum.

MS 70° = Meerschweinchenserum, das vorher eine halbe Stunde auf ca. 70° C erhitzt worden war.

Hämolyse nach 3 Stunden Brutschrank- und 12 Stunden Zimmertemperatur.

Menge des zugesetzten Serums	Hämolyse bei Zusatz von	
	f. MS	MS 70°
0,3	Spürchen	0
0,2	stark	fast 0
0,1	vollkommen	stark
0,05	vollkommen	vollkommen

logische Bedeutung dieser Bindung hin: „Derartig fest gebunden werden die Cholate wohl auch in die Blutflüssigkeit treten, was um so wahrscheinlicher ist, als die Cholate im freien Zustande als Herzgifte bekannt sind."

[1]) Landsteiner und Stankovič, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig. 41, 1, 116, 117. Vgl. hierzu auch H. Sachs (Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 10, 322), der feststellte, daß das Lecithin seine das Kobragift aktivierende Eigenschaft beim Erhitzen mit einer Hämoglobinlösung verliert und auch eine vorher erwärmte Hämoglobinlösung eine „Inaktivierung" des Lecithins herbeiführt.

v. Fenyvessys Inaktivierung der hämolytischen Kombination von Albumin, Gallensäuren und Gallensalzen ist wohl fraglos auf diese erhöhte Bindungskraft erwärmter Eiweißmoleküle zu beziehen.

Die Veränderungen, die das Gallensalzmolekül durch das Herantreten des Eiweißkomplexes erfährt, werden wir uns demnach wohl eher als physikalische, denn als rein chemische vorzustellen haben.[1]) Ebensolche Verhältnisse dürften auch für eine Reihe anderer entgiftender Serumfunktionen (z. B. gegen Seifen, Schwefelharnstoff und Urethan[2]) vielleicht auch gegen die von Bechhold und Ehrlich[3]) beschriebenen neuen Desinfektionsmittel) obwalten.

Ähnliche Beziehungen weist, wie kürzlich Wassermann und Citron[4]) dargetan haben, das Serum auch zu gewissen Nährstoffen auf. Auch dort kommt es zu einer Vereinigung der Moleküle der als Nährstoffe in den Organismus eingeführten Substanzen mit einem im Serum vorhandenen Substrat, eine Bindung, die die genannten Autoren mittels der Bordet-Gengouschen Methode der Komplementfixation nachzuweisen imstande waren.

Auf diese Weise konnte festgestellt werden, daß eine Reihe von Nahrungsstoffen durch eine beträchtliche Affinität zu Serumsubstanzen hingezogen und gebunden werden, welche Verankerung ein Verschwinden von zugesetztem Komplement zur Folge hat. Besonders scharf betonen Wassermann und Citron die teleologische Bedeutung des von ihnen aufgedeckten Phänomens, indem sie darauf hinweisen, „daß durch diese Verbindung das Nährstoffmolekül nach der Richtung hin verändert werde, daß es schwerer ausgeschieden wird, um es so dem Säftestrom bzw. den Zellen zu ermöglichen, die Nährstoffe nach dem Bedarfsorte zu transportieren, wo der Nährstoffhunger, d. h. die erhöhte Spannung zu diesen Stoffen herrscht, und wo

---

[1]) Weitere Argumente zugunsten dieser Auffassung werden noch später im Laufe dieser Mitteilung beigebracht.

[2]) H. Tsurusaki, diese Zeitschr., 10, 348, 1908.

[3]) H. Bechhold und P. Ehrlich, Zeitschr. f. physiol. Chem. 47, 173, 1906.

[4]) Wassermann und Citron, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Therap. 4 (2), 273 bis 320.

sie infolge eben dieser erhöhten Spannung aus dem Blute abgegeben werden."[1])

Die hier für Nährstoffe entwickelten Ansichten müssen um so mehr auch für die Galle Geltung besitzen, da es sich bei dieser, wenn sie, aus dem Darmkanal wieder aufgesaugt, in die allgemeine Zirkulation gelangt, nicht nur um die Sicherung des Transportes des Moleküls, sondern gleizeitig auch um seine Entgiftung handelt. Die von Wassermann und Citron als Nährstoffhunger bezeichnete Attraktionswirkung der Zelle müßte sich im Falle der Galle durch eine die Affinität des Serumeiweißes übertreffende Bindungskraft der Leberzelle für Gallensalze manifestieren.

Diese Überlegungen boten die Anregung, einige für die Lehre vom Gallenkreislaufe interessante Fragen einer experimentellen Prüfung zu unterziehen. Demgemäß soll im folgenden untersucht werden, ob die Bindung zwischen Gallensalzen und den Serumeiweißkörpern tatsächlich der eben erörterten Hypothese entsprechend im Sinne der Erzielung einer schwereren Ausscheidbarkeit zu wirken imstande sei, und ferner, ob sich die zu postulierende Begierde des Leberparenchyms nach Gallensalzen, durch welche diese aus dem zirkulierenden Blute von den Leberzellen abgefangen werden, auch in vitro nachweisen lasse.

Bevor aber an die Erörterung der hier aufgeworfenen Fragen gegangen wird, soll noch vorerst, obzwar das Stattfinden einer Bindung zwischen Gallensalzen und dem Serum bereits durch die früher[2]) und hier mitgeteilten Experimente erwiesen ist, dennoch untersucht werden, ob sich die zur Entgiftung führende Vereinigung von Zelle und Serumeiweiß auch, wie in den Versuchen von Wassermann und Citron, mittels der Komplementfixationsmethode nachweisen lasse.

Diese Versuche[3]) wurden nach dem gewöhnlichen Schema der für Komplementbindungsversuche angewendeten An-

[1]) l. c. 317.

[2]) G. Bayer, Untersuchungen über die Gallenhämolyse. I, diese Zeitschrift 5, 368, 1907.

[3]) Zur Zeit der Ausführung dieser Versuche waren mir die (mir im Original nicht zugänglichen) Untersuchungen von Levaditi und Yamanouchi (Compt. rend. 63) nicht bekannt.

ordnung ausgeführt. Als hämolytisches System dienten Rindererythrocyten, ein inaktiviertes Rinderblutkaninchenimmunserum und als Komplementquelle frisches Meerschweinchenserum. Es wurde meistens mit sensibilisierten und nachher gewaschenen Blutkörperchen gearbeitet.

Eine Komplikation für die Ausführung der Untersuchung lag aber darin, daß im ablenkenden System ein an sich hämolytischer Stoff, die Gallensalze, vorhanden sein mußten. Da aber die Komplementfixation durch die Vereinigung von Gallensalzen und Serum zu erwarten war und eben dieser Zusammentritt zur Entgiftung der Galle in bezug auf ihre hämolytische Wirksamkeit führt, konnte die Versuchsanordnung derartig gestaltet werden, daß die zur Ablenkung des Komplements bestimmte Gruppe an sich für die nachher zugesetzten Erythrocyten indifferent war. Zur Entgiftung der Galle wurde meistens inaktives Hammelserum verwendet. Das Resultat derartiger Versuche zeigen Tabellen II und III.

Tabelle II.

Jedem Röhrchen wurde 1 ccm einer 5%igen Rinderblutkörperchensuspension zugesetzt.

1%ige Lösung v. Natrium glycocholicum	Komplement = 10fach verdünnt. aktives Meerschweinchenserum	Ambozeptor-100fach verdünnt. Rinder-blut-Kaninchen-Immunserum	Inaktives Hammelserum	Hämolyse
0,5	—	—	—	vollkommen nach 15 Min.
0,5	—	—	0,3	nach 15 Stunden 0
—	0,05	0,3	—	nach 1 Stunde 15 Min. fast vollkommen; nach 15 Stunden vollkommen
—	0,05	0,3	0,3	nach 1 Stunde 15 Min. sehr stark; nach 15 Stunden fast vollkommen
0,5	0,05	0,3	0,3	nach 15 Stunden 0

Tabelle III.

Jedes Rörchen enthielt 1 ccm sensibilisierter Rinderblutkörperchen (5%ige Suspension). Die Proben wurden 1 Stunde bei 37° C und weitere 12 Stunden im Eisschrank gehalten.

1%ige Lösung von Natrium glycocholicum	Komplement = 10fach verd. aktives Meerschweinchenserum	Hammelserum 5fach verdünnt	Hämolyse	
			nach 1 Stunde	nach weiteren 12 Stunden
0,35	—	—	vollkommen	—
0,40	—	—	„	—
0,35	—	0,5	0	wenig
0,40	—	0,5	0	„
0,35	0,3	—	deutlich	vollkommen
0,40	0,3	—	„	„
0,35	0,3	0,5	0	wenig
0,40	0,3	0,5	0	„
—	0,3	—	vollkommen	—
—	0,3	0,5	fast vollkom.	vollkommen

Die nachdrücklichste Betonung erheischt der für die Bewertung der hier ausgeführten Versuche prinzipiell ungemein wichtige Umstand, daß im Serum durch glykocholsaures Natrium während der Dauer dieser Versuche keinerlei Niederschlag oder Präcipitation, auch nicht bei Einwirkung weit konzentrierterer Lösung dieses Gallensalzes entsteht; es kann sich demnach nicht etwa um eine Ausfällung oder grob mechanisch vorzustellende Mitreißung des Komplements handeln. Es sei übrigens hier bemerkt, daß auch von anderer Seite auf das Fehlen einer eiweißfällenden Wirkung der Glykocholsäure hingewiesen wurde [1])

So ergibt sich denn aus den in den vorstehenden Tabellen wiedergegebenen Versuchen, die mehrfach mit dem gleichen Resultat wiederholt wurden, daß

[1]) Ivar Bang, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 7, 148, 1906: „. . . da weiters die Glykocholsäure Eiweiß nicht (im Original gesperrt!) fällt und keine unlösliche Eiweißverbindung gibt . . .“

bei der Vereinigung von Cholat- und Eiweißmolekül in analoger Weise wie bei den Versuchen von Wassermann und Citron ein Verschwinden des Komplements stattfindet.[1])

Diese Beobachtung über Komplementbindung in vitro veranlaßte einige weitere Versuche, durch die festgestellt werden sollte, ob eine vorausgehende Injektion gallensaurer Salze auf den Komplementgehalt des daraufhin dem Tiere entnommenen Blutes Einfluß nehme.

Es konnte aber bei den unmittelbar vor und sofort nach intravenöser Injektion sehr großer Mengen von glykocholsaurem Natrium entnommenen Blutproben bei Prüfung der Bactericidie gegen Typhus- und Anthraxbacillen, sowie der Hämolyse gegen Menschenerythrocyten, die wenn auch nicht konstant so doch sehr häufig durch Kaninchenserum bewirkt wird, trotz der gegenteiligen Behauptung Rißlings (Centralbl. f. Bakt., Orig. 44, 676, 1907) kein Unterschied des Komplementgehaltes gefunden werden, so daß Anhaltspunkte für eine intravasale Komplementbindung nach Galleninjektion nicht gewonnen werden konnten.

Die im Reagensglase eintretende Komplementfixation kann wieder als Betätigung der Auffassung der Bindung zwischen Cholat- und Eiweißmolekül als physikalische Zustandsreaktion im Sinne einer Kolloidumhüllung angesehen werden.[2])

II. Über die Bedeutung der Bindung der Cholate an die Serumeiweißkörper für die Ausscheidung der Gallensalze durch den Harn.

Da bei kolloiden Umhüllungen der neue Komplex nach der herrschenden Ansicht die chemischen, physikalischen und physiologischen Eigenschaften des umhüllenden Mediums an-

[1]) Das von H. Konradi (Centralbl. f. Bakt., Ref. 38, 56: Bericht über die erste Tagung der freien Vereinigung f. Mikrobiologie, Berlin 1906) bei Versuchen, die gelegentlich der Ausarbeitung seiner Gallenmethode zur Züchtung der Typhusbacillen aus dem Blute Typhuskranker ausgeführt wurden, konstatierte Verschwinden der Bactericidie des normalen Meerschweinchenserums gegenüber dem Ebertschen Bacillus bei Zusatz von Galle, dürfte wohl nach den hier gewonnenen Erfahrungen auch auf die Erscheinung der Komplementfixation zu beziehen sein.

[2]) Vgl. Landsteiner, Centralbl. f. Bakt. I. Abteilung. Orig. 42, 356.

nimmt, erklärten sich vorerst die hier mitgeteilten Erfahrungen über Entgiftung der Galle durch Serumeiweißkörper. Dann aber leitet diese Vorstellung auch ohne weiteres dazu, die für Serumeiweiß bestehende Undurchlässigkeit der normalen Niere auch für das Cholateiweißmolekül anzunehmen, also mit Wassermann und Citron zu argumentieren, daß die durch die Kuppelung bedingte Zustandsänderung das Molekül in der Richtung verändere, daß es schwerer ausgeschieden werde und so dem Organismus erhalten bleibe.

Um angesichts der Schwierigkeit, diese Hypothese direkt zu beweisen, doch wenigstens einen sie indirekt stützenden Anhaltspunkt gewinnen zu können, untersuchte ich, wie sich Galleserumgemenge der Dialyse gegenüber verhalten.

Es wurdon zu diesem Zwecke einerseits mit Wasser, andererseits mit Hammelserum hergestellte Verdünnungen von Ochsengalle oder Gallensalzlösungen (Natr. glycocholicum) in gleichen Volummengen gegen gleiche Quantitäten destillierten Wassers in Schleicher-Schüllschen Diffusionshülsen dialysiert. Das Resultat eines solchen Versuches zeigt Tabelle IV.

Tabelle IV.

Inhalt der Diffusionshülse	Verhalten des Außenwassers nach 3 × 24 Stunden
0,02 g Natrium glycochol. + 6 ccm physiol. Kochsalzlösung (Thymolzusatz)	Pettenkofers und Udranskis Reaktion positiv; 1 ccm löst 1 ccm 5 %iger Rinderblutaufschwemmung in 6 Stunden vollkommen.
0,02 g Natrium glycochol. + 6 ccm Kaninchenserum (Thymolzusatz)	Pettenkofers und Udranskis Reaktion negativ; keine Hämolyse.

Obwohl natürlich solche Diffusionsversuche eine Vergleichung mit den in der Niere obwaltenden Ausscheidungsverhältnissen nicht gestatten, so beweisen sie andererseits doch wieder, daß die gekuppelten Galleeiweißmoleküle sich auch in physikalisch-chemischer Beziehung wie Eiweißmoleküle verhalten und unterstützen so die Annahme, daß die Bindung

der Gallensalze an die Bluteiweißkörper für die Zurückbehaltung derselben im Körper von Bedeutung sei.

Vielleicht vermag diese Auffassung auch etwas zum Verständnis der Tatsache beizutragen, daß auch bei schwerem Ikterus eine Ausscheidung von Gallensäuren durch den Harn sehr häufig vermißt wird.

Für diejenigen Fälle, in denen es dennoch zu einer Gallensalzelimination durch den Urin kommt, wäre mit Rücksicht auf die so häufig auftretende Albuminurie Ikterischer daran zu denken, ob es sich nicht um den Durchtritt gepaarter Eiweißcholatmoleküle handle.[1]) Die Angaben derjenigen Autoren, welche sich am eingehendsten mit der Untersuchung des Harnes bei Ikterus und nach Gallensalzinjektionen beschäftigt haben, sprechen entschieden in dem Sinne; so wird diese Vermutung besonders durch die Erfahrungen von Feltz und Ritter[2]) bestätigt, die eine größere Anzahl von Kaninchen mit verschiedenen Dosen von Cholaten injizierten; sie fanden den Harn der Versuchstiere nach Injektion kleiner Mengen normal, nach mittleren Gaben nur eiweißhaltig, und erst nach großen Dosen traten zum Eiweiß auch die Gallensalze hinzu. Ebenso weist Bonanni[3]) auf die Koinzidenz von Gallensalzausscheidung mit Albuminurie hin.

Das von Naunyn[4]), Vogel[5]) sowie von Höhnel und Dragendorff[6]) behauptete Vorkommen von Gallensäuren im Harne normaler Menschen — das allerdings v. Udranski[7]) mit seiner ungemein scharfen Reaktion nie konstatieren konnte — würde nicht gegen die hier entwickelte Auffassung, daß nur eine für Eiweiß durchlässige Niere Cholate passieren lasse,

---

[1]) In bezug auf die so oft nach Salicyldarreichung beobachtete meist ganz harmlose Albuminurie liegen vielleicht die Verhältnisse ähnlich. Nach M. Jacobys Vermutung (diese Zeitschr. 9, 526, 1908 „handelt es sich bis zu einem gewissen Grade hier nur um einen Übertritt von Eiweiß aus dem Blut, das im Kreislauf zur Salicylsäure in Beziehung getreten ist, in den Harn".

[2]) Feltz und Ritter, Compt. rend. de l'acad. Paris 79 (2), Nr. 2, 131.

[3]) A. Bonanni, Bull. della R. Acad. med. di Roma 1898, fasc. 1.

[4]) Naunyn, Arch. f. Anat. u. Physiol. 1860.

[5]) Vogel, Malys Jahresberichte 1872.

[6]) Höhnel und Dragendorff, Dissert., Dorpat 1873.

[7]) L. v. Udranski, Zeitschr. f. physiol. Chem. 12, 376, 1888.

sprechen, da ja geringe Grade von Albuminurie bekanntlich bei völlig gesunden Menschen eine häufige Erscheinung ist.[1])

III. Über die Affinität der Leberzellen zu den Gallensalzen.

Die im vorstehenden mitgeteilten Versuche und Betrachtungen bringen insofern einen Beitrag zur Lehre vom enterohepatischen Cholatkreislaufe, als sie einerseits zeigen, daß trotz der hohen Giftigkeit der Gallensalze für isolierte Zellen und Organe eine Zirkulation derselben im normalen Organismus infolge der entgiftenden Wirkung des Blutserums möglich ist, und andererseits indem sie auf eine bisher nicht berücksichtigte Erklärungsmöglichkeit hinweisen für die Tatsache, daß vom Darm aus resorbierte (und eventuell auch auf anderem Wege in den Blutstrom gelangte) Gallensalze wenigstens innerhalb gewisser Grenzen der Exkretion entgehen[2]) und dem Organismus erhalten bleiben.

Für das volle Verständnis des Gallenkreislaufes erscheint es aber auch erforderlich, diejenigen Kräfte, welche den Übergang der im Blute kreisenden Galle auf die Leberzellen bedingen, in ihrem Wesen zu erkennen. Diesen Übergang auf eine hohe, die Affinität des Serumeiweißes übertreffende Bindungskraft der Leberzellen zu beziehen, lag um so näher, als Kallmeyer[3]) gezeigt hatte, daß Leberbrei, der mit physiologischer Kochsalzlösung bis zum Verschwinden der Hämoglobinstreifen gewaschen wird, bei Extraktion mit heißem Wasser und Alkohol und nachfolgender Ätherfällung noch immer eine nicht unerhebliche Quantität von Gallensäuren liefert, ein Befund, der (wie auch Stadelmann[4]) betont) dafür spricht, „daß die Leberzellen Gallensäuren enthalten und dieselben nur

---

[1]) Senator (Die Albuminurie, Berlin 1890, 24 ff.) gibt als Mittelwert aus den von vier Beobachtern an einem, dem kräftigsten Teile der Bevölkerung (Soldaten und Irrenwärter) entnommenen Material von 435 Personen gefundenen Zahlen 41 % Albuminuriker an.

[2]) Diese Erscheinung führte früher bekanntlich zur Auffassung, daß eine Verbrennung bzw. Zersetzung der Cholate im Organismus stattfinde.

[3]) B. Kallmeyer, Über die Entstehung der Gallensäuren und die Beteiligung der Leberzellen bei diesem Prozeß, Dorpater Dissertation 1889.

[4]) Stadelmann, Der Ikterus und seine verschiedenen Formen, Stuttgart 1891, S. 55

ungemein schwer im lebenden Zustande abgeben, d. h. eine große Affinität zu denselben besitzen".

Um nun Aufschluß darüber zu erhalten, ob diese Affinität wirklich der Bindungskraft des Serums für Cholate überlegen sei, wurde untersucht, ob ein Übergang von Cholaten aus dem Serum auf Leberzellen extra corpus stattfinde oder nicht.

Für diese Experimente wurde folgende Versuchsanordnung gewählt.

Zu gleichen Quantitäten eines Gemenges von Kaninchenserum und Gallensalzlösung wurden einerseits 10 ccm verdünnten Leberbreies, andererseits 10 ccm verdünnten Kaninchenserums hinzugefügt. Diese Zusätze (verdünnter Leberbrei und verdünntes Serum) waren so gewählt worden, daß sie annähernd gleichen Eiweißgehalt[1]) besaßen, aber auf Seite des verdünnten Serums sich ein geringer Eiweißüberschuß befand. Auf diese Weise wurden zwei Gemische, A und B, erhalten, deren Zusammensetzung die folgende war:

Gemisch A = { 5 ccm Kanincherserum,
15 ccm 1°/₀iger Lösung von glykocholsaurem Natrium,
10 ccm verdünnter Leberbrei,

Gemisch B = { 5 ccm Kaninchenserum,
15 ccm 1°/₀iger Lösung von glykocholsaurem Natrium,
10 ccm verdünntes Kaninchenserum.

Diese beiden Gemische kamen nun auf eine Stunde in den Brutschrank und wurden hierauf eine Stunde lang im Schüttelapparat geschüttelt. Dann wurden beide Flüssigkeiten zentrifugiert und die klaren Zentrifugate auf ihre hämolytische Fähigkeit geprüft. Wie aus Tabelle V ersichtlich ist, hatte die hämolytische Wirkung bei dem mit Leberzellen digerierten Gemisch stärker abgenommen als bei dem bloß mit Serum versetzten, obwohl bei letzterem die Menge der den Gallensalzen angebotenen Eiweißkörpern eine größere war. Dies läßt den Schluß zu, daß die Bindungskraft des

[1]) Derselbe wurde durch Kochen der angesäuerten Lösungen und Bestimmung des N-Gehaltes des Koagulums ermittelt.

Leberzelleneiweißes tatsächlich größer als die des Serumeiweißes ist.[1])

Tabelle V.

ccm	Hämolyse von 1 ccm 5%iger Rinderblutkörperchenaufschwemmung nach 1h 30′ Brutschrank und 12h Eisschrank
1 ccm Gemisch A	vollkommen
0,5 " " "	stark
0,3 " " "	Spur
0,1 " " "	0
1 " " B	vollkommen
0,5 " " "	vollkommen
0,3 " " "	stark
0,1 " " "	0

Während also durch diesen Versuch der Übergang eines Teiles der Gallensalze aus dem Serum auf die Leberzellen auch in vitro nachgewiesen wurde, konnte für Nierenzellen bei der gleichen Versuchsanordnung eine besondere Affinität zu den Gallensalzen nicht erkannt werden.

Wenn auch die Affinität der Leberzelle die Bindungskraft des Serums für Cholate nur um weniges übertrifft, so sind doch bei der Größe und der reichlichen Vaskularisation der Leber die Bedingungen für einen Übertritt der Gallensalze aus dem strömenden Blute in das Leberparenchym sehr günstige. Es ist selbstverständlich aber überdies auch möglich, daß dieser Übertritt in vivo auch noch durch andere, an den abgestorbenen oder doch schwer geschädigten Leberzellen im Reagensglasversuche sich nicht mehr manifestierende Kräfte bewirkt wird.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Die Gallensalze können durch die Serumeiweißkörper nicht allein ihrer hämolytischen, sondern auch der gegen andere Zellen und Gewebe gerichteten toxischen Eigenschaften beraubt werden.

[1]) Hierbei ist noch zu bedenken, daß die Kombination Leberzelle + Serum nach den Untersuchungen der Dorpater Schule (Anthen, Kallmeyer, Klein und Hofmann) sogar noch zur Neubildung von Gallensäuren Veranlassung gibt.

2. **Diese Entgiftung ist sehr wahrscheinlich auf eine physikalische Zustandsänderung des Cholatmoleküls („kolloide Umhüllung") zu beziehen.**

3. **Vorher erhitztes Serum ist in höherem Maße zur Entgiftung geeignet als unerhitztes.**

4. **Beim Zusammentritt von Gallensalz- und Eiweißmolekülen kommt es zum Verschwinden eventuell vorhandenen Komplementes.**

5. **Durch die Kuppelung an Eiweißkörper wird das Cholatmolekül in der Weise verändert, daß es schwerer ausscheidbar wird.**

6. **Die große Affinität der Leberzelle zu den Gallensalzen, vermöge welcher die im Blute kreisenden Cholate in der Leber fixiert werden, ist im Reagensglase nachweisbar.**

Erklärung der Abbildungen:

Die Figuren der Tafel II. sind durchwegs nach Photogrammen der Originalkurven in ungefähr auf die Hälfte verkleinertem Maßstabe dargestellt.

Fig. 1. Dient zur Demonstration der Aufhebung der Muskelwirkung der Gallensalze durch Serum.

Obere Reihe: Zuckungen eines in ein Gemisch von 0,3 ccm 10 %iger Natriumglycocholat- und 7 ccm physiologischer Kochsalzlösung eingetauchten Frosch-Gastroknemius.

Untere Reihe: Zuckungen des anderen Gastroknemius desselben Frosches, der in ein Gemisch von 0,3 ccm 10%iger Natriumglycocholatlösung und 7 ccm nativem Kaninchenserum eingetaucht ist.

Reizung durch Öffnungsschläge; eine Unterbrechung in der Sekunde.

Anfangserregbarkeit { oberer Muskel: bei 10,0 ccm; unterer Muskel: bei 8,5 ccm.

Erregbarkeit bei x { oberer Muskel: unerregbar; unterer Muskel: bei 7,0 ccm.

Fig. 2., **Fig. 3.** } Versuche an nicht kuraresierten Kaninchen.

Untere Kurve: Blutdruckkurve der Arteria carotis, aufgenommen mit Fickschem Federmanometer.

Obere Kurve: Respirationskurve, verzeichnet mit Mareyscher Trommel unter Vorschaltung eines ca. 12 l fassenden Luftreservoirs (Atemflasche).



GS = 0,3 ccm 10% Lösung von Natriumglycocholat + 10 ccm Kaninchenserum.

GK = 0,3 ccm 10% Lösung von Natriumglycocholat + 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung.

Injektion hirnwärts durch die Carotis communis sinistra.

Fig. 4. Versuch am kuraresierten Kaninchen.

Blutdruckkurve der Arteria carotis, aufgenommen mit Fick-schem Federmanometer.

Inakt. = 0,2 ccm 10%iger Natriumglycocholatlösung + 15 ccm Kaninchenserum.

Akt. = 0,2 ccm 10%iger Natriumglycocholatlösung + 15 ccm physiologischer Kochsalzlösung.

Injektion durch die Vena jugularis dextra herzwärts.

Untersuchungen über die Gallenhämolyse.

III. Mitteilung.

Über die Ursachen der Beschleunigung der Gallenhämolyse in konzentrierten Salzlösungen.

Von

Dr. Gustav Bayer, Assistent.

(Aus dem Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie der k. k. Universität Innsbruck.)

(Eingegangen am 23. Juli 1908.)

In einer früheren Arbeit[1]) wurde darauf hingewiesen, daß die gleiche Quantität von Galle verschieden starke hämolytische Effekte hervorruft, je nach der Konzentration der Kochsalzlösung, in welcher die Gallensalze zur Lösung gebracht werden; die Auflösung der Erythrocyten erfolgt bei höherer Salzkonzentration rascher und intensiver. Zur Illustrierung dieser Tatsache sei auf die der genannten Arbeit entnommene Tabelle I verwiesen.

Tabelle I.

Jedes Röhrchen enthält 0,3 ccm einer $^1/_2\,^0/_0$igen Lösung von Natrium taurocholicum Merck und 3 ccm einer $5\,^0/_0$ Rinderblutkörperchen-Suspension. Die Intensität der Hämolyse wurde mit Fleischls Hämometer gemessen. Ablesung nach 2 Stunden Bruttemperatur und 18 Stunden Zimmertemperatur.

Konzentrierte Kochsalzlösung ccm	Destilliertes Wasser ccm	Salzgehalt in Prozenten der Gesamtflüssigkeit	Intensität der Hämolyse
0,2	0,8	$2{,}26\,^0/_0$	0
0,4	0,6	3,88 „	64
0,6	0,4	5,51 „	220
0,8	0,2	7,14 „	318
1,0	—	8,77 „	440

[1]) Diese Zeitschr. 9, 58, 1908.

Für diese Erscheinung hatte schon Nolf[1]) eine Erklärung zu geben versucht, die von der Ansicht ausging, daß nur nicht dissoziierte Gallensalze in die Erythrocyten einzudringen vermögen und daß die das Eindringen hindernde Ionisierung durch Zusatz von Metallsalzen vermindert bzw. aufgehoben werde.

Aus verschiedenen, in der eben genannten Mitteilung erörterten Gründen war ich genötigt, diese Nolfsche Hypothese zu verwerfen, ohne daß ich damals eine völlig zureichende andere Erklärung an ihre Stelle zu setzen vermochte. Ich konnte nur zeigen, daß die Beschleunigung und Verstärkung, welche die Gallenhämolyse durch Salzzusatz erfährt, auch bei der durch Gallensalzlösungen hervorgerufenen Klärung trüber Lecithinemulsionen stattfindet.

Weitere Untersuchungen haben nun zu einer, wie mir scheint, vollkommen befriedigenden und gleichzeitig interessanten Deutung des Salzbeschleunigungsphänomens geführt, über welche hier berichtet werden soll.

Die Grundlage für jeden Erklärungsversuch der eben besprochenen Erscheinung muß die Annahme bilden, daß die Reaktion zwischen Erythrocytenhülle und Gallensalz durch Salzzusatz im Sinne einer Beschleunigung geändert werde, daß mit anderen Worten die Membran des roten Blutkörperchens das Cholatmolekül bei Salzgegenwart begieriger an sich ziehe.

Daß der Zusatz bestimmter Substanzen die Diffusion durch Membranen (und daher auch die ihr notwendigerweise vorausgehende Adsorption in die Wand) zu ändern imstande ist, ist ja eine den Biologen gut bekannte Tatsache: so wurde z. B. von Fernbach[2]) und anderen nachgewiesen, daß der Zusatz der geringsten Mengen von Alkohol zu Hefekulturen vorübergehenden Austritt von Fermenten aus den Hefezellen veranlasse, welche Fermente gegen Wasser allein nicht diosmieren; zu analogen Resultaten führten die Untersuchungen Pantanellis[3]), der den Einfluß verschiedener Salze und Kolloide auf

---

[1]) P. Nolf, Mecanisme de globulolyse, Annales de l'Inst. Pasteur 14, 1900.

[2]) Fernbach, Annales de l'Inst. Pasteur 4, 672, 1890, zit. nach Zangger[3]).

[3]) Pantanelli, Pressione e tensione delle cellule di lievito, Rendiconti Accad. lincei 14, 720, 1905; 15, 377 u. 587, 1906; zit. nach Zangger.

den Durchtritt von Enzymen durch Hefe- und Schimmelpilzmembranen studierte. In die Gruppe dieser Erscheinungen reiht Zangger[1]) auch die Erfahrungen Höbers[2]) über Änderungen der Permeabilitätsverhältnisse der Erythrocyten nach Kohlensäuredurchleitung durch das Blut.

Die derzeit für diese Erscheinungen allgemein angenommene Erklärung geht dahin, daß chemische oder strukturelle Änderungen der Membran für die Beeinflussung ihrer Durchlässigkeit von ausschlaggebender Bedeutung seien.

Daß solche Änderungen der Permeabilität eines Kolloides durch Aufnahme gewisser Substanzen tatsächlich stattfinden können, beweisen die Erfahrungen über das geänderte Eindringungsvermögen der einzelnen Bestandteile des Fixierbades nach Zusatz von Metalloxyden oder Salzen zur Gelatineschicht photographischer Platten.[3])

Dieser Auffassung folgend könnte man nun auch annehmen, daß durch den höheren Salzgehalt in dem hier diskutierten Falle der Gallenhämolyse eine physikalische oder eine chemische Zustandsänderung der Erythrocytenmembrane bewirkt wird, infolge welcher derselbe für das in der Salzlösung befindliche Cholatmolekül in höherem Maße durchgängig werde, bzw. dasselbe lebhafter adsorbiere, daß also der Salzzusatz stoffliche Änderungen der Hüllschichte der Blutkörperchen bewirke.[4])

---

[1]) H. Zangger, Über Membranen und Membranfunktionen, Ergebnisse d. Physiol. 7, 145, 1908.

[2]) R. Höber, Über Ionenpermeabilität bei Blutkörperchen. Pflügers Arch. 102, 196, 1904.

[3]) Vgl. Lumière und Seyewetz, Wirkung der Alaun- und Tonerdesalze auf die Gelatine. Zeitschr. f. wiss. Photographie 4, 360, 1906; vgl. auch die schönen Untersuchungen von Bechhold und Ziegler, Zeitschr. f. physikal. Chem. 56, 105, 1906.

[4]) Zugunsten einer solchen Auffassung könnten besonders die Resultate von O. Porges und E. Neubauer bezüglich der Zustandsänderungen von Lecithin und Cholesterin durch Salze (Wiener klin. Wochenschr. 1907, Nr. 42, 1285; und ausführlich in dieser Zeitschr. 7, 152, 1908 angeführt werden. Diese Autoren sprechen sich selbst (S. 175) dahin aus, daß es nicht unwahrscheinlich erscheine, daß die Zustandsform des Lecithins in den Zellmembranen durch verhältnismäßig geringfügige Änderungen der Zusammensetzung des umgebenden Mediums Modifikationen erleide, die eine veränderte Permeabilität nach sich ziehe. Aber die sprunghaften Änderungen, die solche Lipoidsuspensionen bei steigen-

Meine Untersuchungen führten mich aber zu einem wesentlich anderen Erklärungsprinzip der besprochenen Phänomene; um später zu Erörterndes hier kurz vorwegzunehmen, sei angedeutet, daß das intensivere Eindringen des Cholates in die Lipoidsubstanz der Erythrocyten durch eine Änderung der die Osmose treibenden Kräfte durch den Salzzusatz erklärt werden kann, ohne daß zur Annahme stofflicher Änderungen der Hüllschicht rekurriert werden muß.

Zu dieser Erkenntnis leitete das sehr interessante Ergebnis von Oberflächenspannungsbestimmungen[1]), welche mit reinen Salzlösungen verschiedener Konzentration und denselben Salzlösungen nach Zusatz von Gallensalzen ausgeführt worden waren.

Diese Bestimmungen wurden nach der Steighöhenmethode unter Anwendung sehr enger Capillaren (behufs Steigerung der Empfindlichkeit) ausgeführt. Die Ermittlung des spezifischen Gewichts der untersuchten Flüssigkeiten wurde mittels Mohrscher Wage vorgenommen. Die Berechnung der Größe der Oberflächenspannung erfolgte nach der Formel

$$\gamma = {}^1/_2 h \varrho s,$$

in welcher h die Steighöhe der Flüssigkeit, ϱ den Radius der zur Bestimmung verwendeten Capillare und s das spezifische Gewicht der untersuchten Lösung bedeutet. Zur Herstellung der Salzlösung diente chemisch reines Chlornatrium (Kahlbaum), das zugesetzte Gallensalz war Natrium taurocholicum Merck, das in 10%iger Lösung verwendet wurde. (0,5 ccm zu je 30 ccm der Salzlösung.)

Diese Bestimmungen (s. Tabelle II u. III) ergaben nun zunächst, daß Gallensalze — wie dies kürzlich auch J. Traube[2])

dem Salzgehalt durchmachen, sowie der Durchgang von Null über ein Maximum zu Null mit einem eventuell wieder darauffolgenden Anstieg, stimmen nicht mit dem gleichmäßigen Wachsen der Hämolyse (bzw. der Lecithinaufhellung) in meinen Versuchen überein, so daß in dieser Beziehung die Annahme eines inneren Zusammenhanges zwischen Lecithinausflockung und Salzbeförderungsphänomen auf Schwierigkeiten stößt.

[1]) Diese Untersuchungen wurden im hiesigen physikalischen Institute ausgeführt; es obliegt mir, Herrn Prof. Dr. v. Lerch und Herrn Assistenten Dr. Kofler für ihr freundliches Interesse und Entgegenkommen ergebenst zu danken.

[2]) J. Traube, Über die Wirkung lipoidlöslicher Stoffe auf rote Blutkörperchen, diese Zeitschr. 10, 371, 1908.

angegeben hatte — die Oberflächenspannung wässeriger Lösungen ganz beträchtlich herabsetzen. Sehr beachtenswert aber erscheint die Tatsache, daß diese Herabsetzung entsprechend der steigenden Kochsalzkonzentration in ganz bedeutender Weise zunimmt.

Dieses Phänomen, das an sich für den Physikochemiker von Interesse sein dürfte, bildet nun den Ausgangspunkt für die Erklärung der Erscheinung des Salzbeschleunigungsphänomens der Gallenhämolyse und der Lecithinemulsionsklärung.

Diese Erklärung fußt auf einer Reihe interessanter, dem Gebiete der physikalischen Chemie angehörender Tatsachen,

Tabelle II.

$\varrho = 0{,}214$ mm.

Untersuchte Flüssigkeit	Steighöhe in Millimeter	Spezifisches Gewicht	Oberflächenspannung	Abnahme der Oberflächenspannung	
				absolut	prozentisch
Destilliertes Wasser	67,2	1,001	7,20[1]	1,66	23 %
Destilliertes Wasser + Gallensalz	51,7	1,001	5,34		
10 %ige Kochsalzlösung	65,7	1,066	7,49	3,17	42,3 %
10 %ige Kochsalzlösung + Gallensalz	37,9	1,065	4,32		
20 %ige Kochsalzlösung	64,8	1,123	7,79	3,56	45,7 %
20 %ige Kochsalzlösung + Gallensalz	35,3	1,121	4,23		
30 %ige Kochsalzlösung	64,0	1,174	8,04	3,79	47,1 %
30 %ige Kochsalzlösung + Gallensalz	33,8	1,171	4,25		

[1]) Die Kapillarkonstante ist bekanntlich in hohem Maße von der Reinheit der untersuchten Flüssigkeit abhängig. Das hier untersuchte und zur Herstellung der Kochsalzlösungen verwendete Wasser wurde ohne sonderliche Kautelen einmal aus Leitungswasser abdestilliert und noch am selben Tage verwendet. Die für die Oberflächenspannung dieses destillierten Wassers erhaltene Größe kann daher nicht Anspruch auf absolute Anerkennung erheben. Dieselbe steht aber immerhin in der Mitte zwischen den von Grumnach (Annal. d. Physik 3, 660) für destilliertes Wasser und für sehr sorgfältig destilliertes Wasser gefundenen Werten. (Vgl. M. Roloff, in Koranyi und Richters Handb. f. physikal. Chem. u. Med. 1, 98, Leipzig 1907/1908.

Tabelle III.

$\varrho = 0{,}231$ mm.

Unsersuchte Flüssigkeit	Steighöhe in Millimeter	Spezifisches Gewicht	Oberflächenspannung	Abnahme der Oberflächenspannung absolut	Abnahme der Oberflächenspannung prozentisch
2%ige Kochsalzlösung[1] . .	45,4	1,015	5,32	2,75	51,6%
2%ige Kochsalzlösung + Gallensalz	21,9	1,015	2,57		
4%ige Kochsalzlösung . . .	45,1	1,028	5,34	2,82	52,8%
4%ige Kochsalzlösung + Gallensalz	21,2	1,028	2,52		
6%ige Kochsalzlösung . . .	44,6	1,041	5,36	2,85	53,1%
6%ige Kochsalzlösung + Gallensalz	19,6	1,041	2,51		
8%ige Kochsalzlösung . . .	44,2	1,054	5,38	3,30	61,3%
8%ige Kochsalzlösung + Gallensalz	17,1	1,053	2,08		

die, im wesentlichen von W. Gibbs[2]) entdeckt, durch J. Traube[3]) eine bedeutende Vertiefung und reichliche Anwendung auf biologische Probleme erfahren haben.

Hierher gehört zunächst das heute wohl allgemein anerkannte Gesetz, daß **Substanzen, die die Oberflächenspannung ihres Lösungsmittels herabsetzen, in den Oberflächen konzentriert werden.** Die Giltigkeit dieses ursprünglich für kolloide Stoffe aufgestellten Salzes wurde durch Thompson[4]) auch für krystalloide Substanzen nachgewiesen, was für den vorliegenden Fall darum wichtig erscheint,

[1]) Zur Herstellung dieser Salzlösungen wurde dasselbe destillierte Wasser wie im vorhergehenden Versuche (Tabelle II), aber erst nach viertägigem Stehen in verschlossener Glasflasche verwendet. Das zu diesem Versuche (Tabelle III) benützte taurocholsaure Natrium war aus dem Merckschen Präparat durch Ätherfällung aus Alkohollösung genommen worden.

[2]) W. Gibbs, On the equilibrium of heterogeneous substances. Trans. Connecticut Acad. 3, 1874 bis 1878 108, 343, 380, (zit. nach Zangger).

[3]) J. Traube, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 17, 2294, 1884; Journ. f. prakt. Chem. 31, 177, 1887; Annal. d. Chem. u. Pharm. 265, 27; Pflügers Archiv 105, 541 und 559; 123, 419; diese Zeitschr. 10, 371, 380, 387, 390, 396, 1908.

[4]) Thompson, Application of dynamics to Physic and Chemistry 251.

weil die Gallensalze nach gewissen eigenen Erfahrungen und besonders nach den Untersuchungen von S. Bondi[1]) in Wasser in Form echter Lösung vorhanden sein dürfte.

Durch Traube hat dieses Gibbssche Theorem nun folgende Formulierung erhalten:

„Je mehr ein Stoff die Oberflächenspannung eines Lösungsmittels vermindert, um so leichter wird er aus den Lösungen entweichen, um so leichter wird derselbe von einer mit der Lösung in Berührung befindlichen festen oder flüssigen Phase adsorbiert oder gelöst.“

Es werden sich demnach die Gallensalzmoleküle in Blutkörperchenemulsionen um die Erythrocyten herumlagern, und zwar um so rascher und intensiver, je konzentrierter die als Lösungsmittel benützte Kochsalzlösung[2]) ist.

Hierzu kommt noch folgender Umstand: Nach Traubes Versuchen ist die Osmose eine Funktion der Differenz der Oberflächenspannungen der beiden aneinander grenzenden Flüssigkeiten; die Osmose findet in der Richtung von der geringeren zur größeren Oberflächenspannung statt, ihre Geschwindigkeit wächst mit der Größe der Differenz der Oberflächenspannungen.[3])

---

[1]) S. Bondi, Beiträge z. Chem. der Galle II, Zeitschr. f. physiol. Chem. 53, 8, 1907; ob der krystalloide Charakter der Cholatlösungen auch bei Salzzusatz erhalten bleibt, scheint mir nicht ganz sicher; hier könnte es sich recht wohl um eine mit wachsendem Salzgehalt zunehmende Aggregation der Moleküle zu immer größeren Verbänden (Ultramikronen) handeln, welche Zusammenballung schließlich bei gewissen Salzlösungen zur makroskopisch wahrnehmbaren Ausflockung führt; durch ein solches Geschehnis könnte dann auch die zunehmende Beeinflussung der Oberflächenspannung eine Erklärung finden. (Vgl. hierzu die Ausführungen über den zweiphasischen Zustand der Lösungen hydrophiler Kolloide bei Michaelis, Physikal. Chem. d. Kolloide, Koranyi und Richters Handbuch, 2, 399, 1908.)

[2]) Übrigens wirken auch Salze anderer Säuren und anderer Basen qualitativ ebenso; in quantitativer Beziehung hängt die Wirkung sowohl vom Anion als auch vom Kation ab.

[3]) Zur gleichen Auffassung bezüglich der Triebkräfte der Osmose gelangten auch Battelli und Stefanini, Rev. scientif. [5], 4, 705—708, 743 bis 745; zit. nach Malys Jahresberichten 1905, 104: ähnlich auch die Auffassung von Freundlich, Zeitschr. f. physikal. Chem. 57, 385 1907.

Demzufolge ist es klar, daß mit dem stärkeren Absinken der Kapillarkonstante in konzentrierteren Kochsalzlösungen auch die Geschwindigkeit des Eintrittes in die Lipoidsubstanzen des roten Blutkörperchens wachsen muß; da nun das Lecithin der Erythrocytenmembran durch das eindringende Gallensalz in einen wasserlöslichen Zustand übergeführt wird, kommt es zum Austritt des Hämoglobins in die Suspensionsflüssigkeit, also zur Hämolyse.

Zur Ergänzung und Prüfung der hier auseinandergesetzten Auffassung wurde weiterhin noch untersucht, ob der Verteilungskoeffizient der Gallensalze zwischen lipoider und wässeriger Flüssigkeit durch Erhöhung des Salzgehaltes der letzteren eine Änderung erfahre.

Es war ja zu vermuten, daß entsprechend der stärkeren Hämolyse in Lösungen mit höherem Salzgehalte auch der Verteilungskoeffizient in dem Sinne sich ändern werde, daß bei stärkerer Salzkonzentration auch größere Mengen von den Cholaten in das Lipoid übertreten werden.

Diese Vermutung wurde durch das Resultat eines Versuches bestätigt, bei dem Gallensalzlösungen mit verschiedenem Kochsalzgehalt mit Olivenöl geschüttelt wurden und nachher die Menge der in der wässerigen Schichte zurückgebliebenen Cholate bestimmt wurde (vgl. Tabelle IV).

Tabelle IV.

Kochsalzgehalt der Gallenlösungen	Gallensalzgehalt (in g)	
	vor dem Schütteln mit Olivenöl	nach dem Schütteln mit Olivenöl
0,9 %	0,4293	0,4135
15 %		0,3961
30 %		0,3415

Für die Verteilung ist eben nicht allein die Löslichkeit bestimmend, sondern — wie dies sehr deutlich zuerst Spiro[1]) ausgesprochen hat — noch ein anderer Faktor, die Lösungsintensität (Spiro), der Haftdruck (J. Traube). Dieser Faktor ist aber im System Wasser — Gallensalz — Neutralsalz eine Funktion des Neutralsalzgehaltes.

[1]) K. Spiro, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 4, 312, 1904.

Es sei hier noch darauf hingewiesen, daß in der Gespinnstfärberei eine Reihe von Farbstoffen Verwendung findet, deren wässerige Lösungen an sich die Gewebe nur sehr wenig färben oder fast ganz ungefärbt lassen und die erst nach Zusatz von Salzen (Kochsalz, Glaubersalz, Natriumphosphat) in die Faser gut einzudringen vermögen. Witt[1]) erklärt diese Erscheinung dadurch, daß durch den Salzzusatz die Löslichkeit des Farbstoffes im Farbbade vermindert wird, wodurch eine Verschiebung des Verteilungskoeffizienten (bzw. Adsorptionskoeffizienten) Farbbad: Faser zugunsten der letzteren bewirkt wird. — Hierher dürfte wohl auch die Tatsache gehören, daß nach Michaelis und Rona[2]) Adsorptionsverbindungen von Mastix mit Trypsin nur bei Salzzusatz ($MgSO_4$) erzielbar sind. Es sei hier auch an das eigentümliche Verhalten gewisser Desinfizientien erinnert, auf welches Scheurlen[4]) hingewiesen hat. Er zeigte, daß durch Zusatz von Salzlösungen die Wirkung des Phenols und seiner Homologen bedeutend verstärkt werden kann.

Hier möchte ich auch noch anführen, daß die von mir beschriebene Verzögerung der Gallenhämolyse durch Lecithin und durch Cerebrin[3]) ebenfalls in der Technik der Faserfärbung ein schönes Analogon finden. Einzelne Farbstoffe besitzen eine so enorme Affinität zu Gespinnstfasern, daß die Färbung bei nicht völlig gleichzeitigem Eintauchen aller Partien des zu färbenden Materials sehr ungleichmäßig ausfällt. Zu solchen Farbbädern pflegen die Färber Kolloide (lösliche Eiweißkörper, Tischlerleim u. a. m.) zuzusetzen, wodurch die allzu rasche Tinktion, das sogenannte „Anfallen" des Farbstoffes, vermieden wird, ohne daß die Intensität der Färbung leidet.[5]) Ebenso wird durch Lecithin und Cerebrin das „Anfallen" des Cholates an die Erythrocyten verhindert, ohne daß die Intensität der Hämolyse beeinträchtigt wird.

---

[1]) Otto N. Witt, in „Enzyklopädie der mikroskopischen Technik" 1, 316, 1903.

[2]) L. Michaelis und P. Rona, Über die Löslichkeitsverhältnisse von Albumosen und Fermenten mit Hinblick auf ihre Beziehungen zu Lecithin und Mastix, diese Zeitschr. 4, 20, 1907.

[3]) Diese Zeitschr. 5, 368, 1907.

[4]) Scheurlen, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 37.

[5]) Vgl. Otto N. Witt, l. c.

Über die quantitative Bestimmung des Milchzuckers mittels ammoniakalischer Kupferlösung.

Von

Yoshitaka Shimidzu.

(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Universität Tokio.)

(Eingegangen am 27. August 1908.)

Die quantitative Bestimmung des Milchzuckers kann ebenso wie die des Traubenzuckers entweder auf gewichtsanalytischem, volumetrischem oder optischem Wege ausgeführt werden.

Unter den vielen gewichtsanalytischen Methoden wird das Allihn-Soxhletsche Verfahren[1]) im allgemeinen als die beste Methode vorgezogen. Leider ist dieselbe etwas umständlich und zeitraubend.

Was die volumetrische Methode mittels Fehlingscher Lösung betrifft, so ist die Ausführung der einzelnen Proben zwar einfach, aber die Feststellung des richtigen Wertes ist nicht so leicht. Man soll nach Soxhlet[2]) am besten mehrere Proben systematisch anstellen, indem man für ein gegebenes Volum der verdünnten Zuckerlösung verschiedene Mengen Fehlingscher Lösung auf einmal zusetzt und darauf genau 6 Minuten lang kocht. Es werden mindestens 7 solche Proben angestellt. Hieraus wählt man diejenige aus, welche die genau stimmende Endreaktion anzeigt. Wie man sieht, ist das Verfahren ziemlich umständlich.

Was endlich die optische Methode anbelangt, so bedarf

---

[1]) Allihn-Soxhlet, Chemie der Zuckerarten von v. Lippmann, III. Aufl., 1904, II. Halbbd., S. 1578; und Milch- und Molkereiprodukte von F. Stohmann, 1898, S. 285.

[2]) Soxhlet, Milch- und Molkereiprodukte von F. Stohmann, 1898, S. 290.

dieselbe geübter Augen und eines kostspieligen Apparates. Somit ist dieselbe ebenfalls für praktischen Zweck nicht geeignet.

Deshalb kommt gegenwärtig trotz der Umständlichkeit das Allihn-Soxhletsche gewichtsanalytische Verfahren von den zahlreichen Methoden hauptsächlich in Anwendung.

Vor kurzem hat nun T. Kinoshita[1]) durch die vergleichenden Untersuchungen festgestellt, daß die Titriermethode nach Pavy-Kumagawa-Sutō für die Traubenzuckerbestimmung in der Genauigkeit mit der Allihnschen Gewichtsanalyse wetteifert, in der Leichtigkeit, Schnelligkeit und der Ausführung dieselbe jedoch bei weitem übertrifft.

Es war deshalb interessant zu prüfen, ob sich die ammoniakalische Kupfermethode für die Milchzuckerbestimmung mit gleichem Erfolge verwenden ließe, wie es Kinoshita für die Traubenzuckerbestimmung getan hat. Zu dem Zwecke habe ich auf Veranlassung von Herrn Prof. M. Kumagawa und mit seiner sowie Prof. K. Sutōs Unterstützung die nachstehenden Untersuchungen angestellt und dabei das Resultat erhalten, daß die neue Methode bei geeigneter Modifikation auch für die Milchzuckerbestimmung vortreffliche Dienste leistet.

Bei den volumetrischen Methoden stimmen die Angaben über die Reduktionskraft des Milchzuckers nicht überein. So reduzieren nach Soxhlet[2]) 0,5 g Milchzucker in 1%iger Lösung 74 ccm Fehlingscher Lösung. Demnach verhält sich die Reduktionskraft des Milchzuckers zu der des Traubenzuckers wie 74 zu 100. Pavy[3]), welcher mit seiner ursprünglichen Ammoniak-Kupferlösung entsprechende Versuche angestellt hat, gibt an, daß das obige Verhältnis etwa 60 zu 100 betrage, und bemerkt dazu, daß die Endreaktion sowohl für die ammoniakalische Kupferlösung wie für die Fehlingsche Lösung bei dem Milchzucker weniger scharf ausgeprägt sei als bei den anderen Zuckerarten. Ich habe bei der direkten Titration ebenso mißliche Erfahrung wie Pavy gemacht.

In den folgenden Untersuchungen habe ich ausschließlich Merckschen Milchzucker benutzt, welcher noch einmal um-

---

[1]) Kinoshita, diese Zeitschr. 9, 208, 1908.

[2]) Soxhlet, Chemie der Zuckerarten von v. Lippmann, 3. Aufl. 1904, II. Halbbd., S. 1578.

[3]) Pavy, Physiologie der Kohlenhydrate von Pavy, 1895, S. 14.

kristallisiert wurde und in fein pulverisiertem Zustande vor der Herstellung der Lösung bei 100° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet war ($C_{12}H_{22}O_{11}.H_2O$). Hiervon wurden genau 0,2 g in Wasser aufgelöst uud bei 17° C auf 100 ccm aufgefüllt. Im folgenden gebe ich die Konzentration mit dem Ausdruck „*g/dl*" (Gramm-Deziliter) nach Sutō[1]) an. Was die Titration selber anbelangt, so bin ich in der ersten Phase genau den Angaben von Kumagawa-Sutō[2]) gefolgt. Von der gesondert aufbewahrten Kupferlösung[3]) und der ammoniakalischen Seignettesalzlösung wurden für jede Probe je 20 ccm zusammen in den Reduktionskolben gebracht (entsprechend 0,01 g Traubenzucker) und bis zum Sieden erhitzt. Hiernach wurde bei kleiner Flamme die Zuckerlösung aus der Bürette in einem Tempo von 90 bis 120 Tropfen in der Minute eingeträufelt. Nach dem Zusatz der gewünschten Menge Zuckerlösung wurde die Zeit des Kochens bei allen Proben zum Schluß genau noch 6 Minuten inne gehalten. Da der Milchzucker auf die ammoniakalische Kupferlösung viel langsamer reduzierend wirkt als der Traubenzucker, so war es mir nicht möglich, wie beim Traubenzucker für jede Probe die richtige Endreaktion zu erzielen, weil die unregelmäßige Verschiebung der Kochdauer die Endreaktion merklich beeinträchtigt. Deshalb habe ich in diesem Punkte abweichend vom Kumagawa-Sutōschen Verfahren ohne Berücksichtigung der Endreaktion systematisch mehrere Proben mit verschiedenem Zuckerzusatz, aber mit gleicher Kochdauer, für die Beendigung der Titration ausprobiert, wie es Soxhlet für die Fehlingsche

---

[1]) Sutō, Ikwagakujisshu (Japanisch abgefaßtes Praktikum der medizinischen Chemie von K. Sutō), 2. Aufl., S. 9.

[2]) Kumagawa-Sutō, Salkowski-Festschrift, 1904, 211; und Kinoshita, diese Zeitschr. 9, 219, 1908.

[3]) Die von Kumagawa-Sutō modifizierte Kupferlösung ist folgende:

I. Krystallisiertes Kupfersulfat . . . . 4,278 g,
mit Aq. dest. aufgefüllt zu . . . . 1 Liter.

II. Weinsaures Kali-Natron (Seignettesalz) . . . . 21 g,
Ätzkali . . . . 21 g,
konzentrierte Ammoniaklösung (spez. Gew. 0,880) . . . . 300 ccm,
alles zusammen mit Aq. dest. aufgefüllt zu . . . . 1 Liter.

Für jede Probe nimmt man je 20 ccm der beiden Lösungen; dieselben müssen stets getrennt aufbewahrt werden.

Lösung empfohlen hat. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle verzeichnet.

0,2 *g/dl* Milchzuckerlösung.

Versuchsnummer	Verbrauch der Zuckerlösung in ccm	Endreaktion
1	8,0	noch nicht erreicht
2	10,0	schon überschritten
3	9,0	,, ,,
4	8,5	noch nicht erreicht
5	8,7	,, ,, ,,
6	8,9	schon überschritten
7	8,8	noch nicht erreicht
8	8,85	genau erreicht.

Somit wurden 40 ccm ammoniakalischer Kupferlösung durch 8,85 ccm 0,2 *g/dl*iger Milchzuckerlösung gerade genau reduziert. Demnach entsprechen 40 ccm Pavy-Kumagawa-Sutōscher Kupferlösung 0,0177 g Milchzucker gegenüber 0,01 g Traubenzucker. Hieraus berechnet sich, daß die Reduktionskraft des Milchzuckers zu der des Traubenzuckers sich wie 56,5 zu 100 verhält.

Wie Pavy angibt, tritt die Endreaktion bei dem Milchzucker nicht scharf ein. Vor dem vollständigen Verschwinden der blauen Farbe tritt häufig schon ein gelber Strich auf. Bei etwas starker Erhitzung oder bei zu langer Kochdauer entweicht das Ammoniak zu reichlich, und infolgedessen tritt eine Ausscheidung des Kupferoxydulhydrates ein, was die Endreaktion wesentlich beeinträchtigt.

Da also die direkte Titrierung des Milchzuckers mittels ammoniakalischer Kupferlösung erst auf mühsamem Wege zum Ziele führt, so ist dieses Verfahren wegen der Umständlichkeit und vieler störenden Nebenumstände für praktische Zwecke nicht verwertbar.

Indirekte Titrierung des Milchzuckers mittels ammoniakalischer Kupferlösung nach vorangegangener Inversion.

Bekanntlich stellt der Milchzucker nach der Inversion ein Gemenge von gleichen Teilen d-Glucose und d-Galactose dar. Deshalb muß die Reduktionskraft des Milchzuckers nach der

Inversion die Hälfte der Summe der beiden Reduktionskräfte von d-Glucose und d-Galactose betragen. Es war darum nötig, vorerst das Reduktionsvermögen der d-Galactose genau zu ermitteln. Zu dem Zweck habe ich folgende Versuche angestellt.

Die d-Galactose von Merck wurde durch Umkrystallisation aus Methylalkohol gereinigt und vor dem Gebrauche bei 100° C auf konstantes Gewicht gebracht. Die Titrierung wurde mit 0,1 *g/dl*iger Lösung genau nach der Vorschrift von Kumagawa-Sutō ausgeführt. Die Endreaktion trat ebenso scharf und glatt wie bei Glucose ein.

Die Ergebnisse der Versuche sind, wie folgt:

0,1 *g/dl* d-Galactoselösung.

Versuchsnummer	Verbrauch der Zuckerlösung in ccm	Verbrauchte Zuckermenge in g
1	11,78	0,01178
2	11,80	0,01180
3	11,79	0,01179
4	11,79	0,01179
Durchschnitt	11,79	0,01179

Demnach werden 40 ccm Kupferlösung genau durch 0,01179 g d-Galactose reduziert. Die nötige Menge des invertierten Milchzuckers für eine Pavy-Kumagava-Sutōsche Probe berechnet sich somit zu

$$\frac{0{,}01 + 0{,}01179}{2} = 0{,}010895.$$

Es müssen also 0,010895 g Milchzucker nach der Inversion 40 ccm ammoniakalischer Kupferlösung eben vollständig reduzieren. Mit dieser theoretischen Berechnung stimmen die folgenden Untersuchungen in der Tat genau überein.

Für die Titrierung wurden je 0,5 g reiner getrockneter d-Galactose und d-Glucose von Merck in 1 Liter Wasser aufgelöst.

Die Resultate der Titration sind wie folgt:

0,1 *g/dl* Zuckerlösung ($^1/_2$ d-Glucose + $^1/_2$ d-Galactose).

Versuchsnummer	Verbrauch der Zuckerlösung in ccm	Verbrauchte Zuckermenge in g
1	10,88	0,01088
2	10,90	0,01090
3	10,91	0,01091
Durchschnitt	10,897	0,010897

Berechnet . . . . 0,010895 g
Gefunden . . . . 0,010897 g

Die Endreaktion trat dabei sehr scharf auf.

Nach diesen Ergebnissen ließ sich vermuten, daß die Pavy-Kumagawa-Sutōsche Methode auch für die Milchzuckerbestimmung eine praktische Verwendung gestatten würde, falls die vorangehende Inversion einfach und glatt erfolgt.

Ehe ich zur eigentlichen Inversion des Milchzuckers schreite, schicke ich hier zunächst einige Bemerkungen über das Verhalten dieses Zuckers gegen anorganische Säuren beim Erwärmen voraus.

Hierüber sagt Ost[1]) folgendes: „Wenn man 1 g Zucker mit 0,5 g Salzsäure in 80 bis 85 ccm Wasser 5 Stunden lang erhitzt, so wird jener merklich angegriffen, Galactose stärker als Glucose.“ Um dieses Verhalten zu prüfen, habe ich für unseren Zweck in etwas abgeänderter Form folgende Versuche angestellt.

0,1 g d-Glucose und 0,1 g d-Galactose wurden zusammen in 100 ccm 10%iger Schwefelsäure aufgelöst, $^1/_2$ Stunde lang auf dem Wasserdampfbade erhitzt (auf dem kochenden Wasserbade mit Glasglocke bedeckt[2]) und nach dem Erkalten mit Natronlauge gerade neutralisiert. Die Lösung wurde alsdann mit Wasser genau zu 200 ccm aufgefüllt.

0,1 *g/dl* Zuckerlösung ($^1/_2$ Glucose + $^1/_2$ Galactose) mit Säure behandelt.

Versuchsnummer	Verbrauch der Zuckerlösung in ccm	Verbrauchte Zuckermenge in g
1	10,90	0,01090
2	10,90	0,01090
Durchschnitt	10,90	0,01090

[1]) Ost, Fresenius-Zeitschr. f. anal. Chem. 29, 685.
[2]) Kumagawa-Sutōs einfaches Dampfbad, diese Zeitschr. 8, 264, 1908.

Demnach ist sowohl d-Glucose als d-Galactose gegen 10 %ige Schwefelsäure bei halbstündigem Erhitzen vollkommen resistent.

Zur Übersicht werden die gefundenen Hauptergebnisse hier in einer Tabelle zusammengestellt.

Zuckerarten	Verbrauch der Zuckerlösung (0,1 *g/dl*) in ccm	Verbrauchte Zuckermenge in g
d-Glucose	10,00	0,01000
d-Galactose	11,79	0,01179
$^1/_2$ d-Glucose + $^1/_2$ d-Galactose		
$^1/_2$ „ berechnet	10,895	0,010895
$^1/_2$ „ gefunden	10,897	0,010897
$^1/_2$ „ mit H_2SO_4 erhitzt	10,900	0,010900

Demnach entspricht die Reduktionskraft von 0,0109 g eines Gemenges gleicher Teile von d-Glucose und d-Galactose genau 40 ccm der Pavy-Kumagawa-Sutōschen Kupferlösung.

Inversion des Milchzuckers.

Wie gesagt, setzt die richtige Titration des Milchzuckers mittels ammoniakalischer Kupferlösung eine einfache und glatte Inversion voraus. Deshalb habe ich im folgenden die Inversion des Milchzuckers mit Säuren etwas eingehender geprüft.

Nach Ost[1]) verläuft die Spaltung des Milchzuckers am glattesten, wenn man einen Teil Milchzucker mit 4 Teilen 2 %iger Schwefelsäure 6 Stunden oder mit 10 Teilen ebenso starker Säure 4 Stunden auf dem Wasserbade kocht. Der letzteren Angabe von Ost folgend, habe ich 1,0 g Milchzucker in 10 ccm 2 %iger Schwefelsäure 4 Stunden lang gekocht. Die Flüssigkeit färbte sich dabei stark. Nach der Neutralisation mit Natronlauge wurde sie mit Wasser auf 1 Liter aufgefüllt und nach Pavy-Kumagawa-Sutō titriert.

Die Resultate sind:

---

[1]) Ost, Zeitschr. f. anal. Chem. 29, 651 u. 657; und Chemie der Zuckerarten von v. Lippmann, 3. Aufl. 1904, II. Halbbd., S. 1550.

Versuchsnummer	Verbrauch der Zuckerlösung (0,1 g/dl)
1	10,92 ccm
2	10,94 „
3	10,93 „
Durchschnitt	10,93 ccm

$$\text{also: } \frac{0{,}0109 \times 100}{10{,}93} = 0{,}09973\ g/dl.$$

Demnach war die Inversion vollständig und kein merklicher Verlust zu konstatieren.

Ost[1]) giebt ferner an, daß der Milchzucker die höchste Reduktionskraft anzeigt, wenn 1,0 g Milchzucker mit 0,5 g Salzsäure in 80 bis 85 ccm Wasser 5 bis 7 Stunden gekocht werden. Hierzu habe ich 1,0 g Milchzucker in 85 ccm 0,6 $^0/_0$iger Salzsäure 5 Stunden gekocht. Dabei war die Flüssigkeit fast farblos. Nach der Neutralisation wurde die Flüssigkeit auf 1 Liter aufgefüllt und nach Pavy-Kumagawa-Sutō titriert.

Die Ergebnisse sind, wie folgt:

Versuchsnummer	Verbrauch der Zuckerlösung (0,1 g/dl)
1	10,94 ccm
2	10,94 „
Durchschnitt	10,94 ccm

$$\text{also: } \frac{0{,}0109 \times 100}{10{,}94} = 0{,}09963\ g/dl.$$

Demnach war die Inversion hier ebenso vollständig wie vorher.

Somit sind die Ostschen Angaben von mir vollständig bestätigt worden. Nach Ost sind indessen für jede Inversion mindestens 4 Stunden erforderlich. Um die Zeit der Inversion möglichst abzukürzen, habe ich folgende Versuche mit verschiedenen Konzentrationen der Säure und viel verdünnterer Zucker-

[1]) Ost, l. c.

lösung ausprobiert. Nach der Abstumpfung der Säure mittels Natronlauge bis zu ganz schwach saurer Reaktion wurde der ursprüngliche Zuckergehalt mit Wasser genau zu 0,1 *g/dl* verdünnt und nach Pavy-Kumagawa-Sutō titriert.

Die Resultate der Untersuchungen sind in den nachstehenden Tabellen zusammengestellt, indem die Intensität der Verfärbung nach der Inversion mit Zeichen +++ (stark), ++ (mittelstark), + (schwach) und — (keine Farbenveränderung) bezeichnet wurde.

I. Inversion mit 2 % H_2SO_4.

Versuchs-Nummer	Zuckermenge (g) in 10 ccm 2 % H_2SO_4	Kochdauer in Std.	Gelbfärbung nach Inversion	Verbrauch der Zuckerlösung (0,1 *g/dl*) in ccm	Gefundener Zuckergehalt der Lösung in *g/dl*	Fehler in %
1[1]	10,0	4	+++	10,93	0,09973	— 0,27
2	0,5	2	—	10,93	0,09973	— 0,27
3	0,5	1/2	—	12,30	0,08862	—11,38

Demnach sind mit 2 %iger Schwefelsäure für die vollständige Inversion 2 Stunden erforderlich.

II. Inversion mit 5 % H_2SO_4.

Versuchs-Nummer	Zuckermenge (g) in 100 ccm 5 % H_2SO_4	Kochdauer in Std.	Gelbfärbung nach Inversion	Verbrauch der Zuckerlösung (0,1 *g/dl*) in ccm	Gefundener Zuckergehalt der Lösung in *g/dl*	Fehler in %
1	2,0	2	++	10,88	0,10018	+ 0,18
2	1,0	1	—	10,90	0,10000	0
3	0,5	1/2	—	11,47	0,09503	— 4,97

Die Inversion mit 5 %iger Schwefelsäure ist nach 1 bis 2stündiger Kochdauer zwar schon vollendet, aber bei 1/2 stündigem Kochen unvollständig.

---

[1]) Versuch 1 ist die schon oben angegebene Inversion nach Ostscher Angabe.

III. Inversion mit 10 % H_2SO_4.

Versuchs-Nummer	Zuckermenge (g) in 100 ccm 10 % H_2SO_4	Kochdauer in Std.	Gelbfärbung nach Inversion	Verbrauch der Zuckerlösung (0,1 *g/dl*) in ccm	Gefundener Zuckergehalt der Lösung in *g/dl*	Fehler in %
1	2,0	1	++	10,95	0,09954	— 0,46
2	1,0	5	+++	10,95	0,09954	— 0,46
3	1,0	1	—	10,90	0,10000	0
4	1,0	1/2	—	10,93	0,09973	— 0,27
5	0,5	1/2	—	10,88	0,10018	+ 0,18
6	0,5	1/3	—	11,13	0,09793	— 2,07
7	0,25	5	++	10,98	0,09927	— 0,73
8	0,25	1	—	10,88	0,10018	+ 0,18
9	0,25	1/2	—	10,88	0,10018	+ 0,18
10	0,25	1/3	—	11,05	0,09864	— 1,36

Die Inversion mit 10 %iger Schwefelsäure gibt bei der Konzentration des Zuckers von 1,0 bis 0,25 *g/dl* in der Kochdauer von 1 bis 1/2 Stunde das beste Resultat. Indes ist eine Kochdauer von nur 1/3 Stunde für die vollständige Inversion nicht ausreichend.

IV. Inversion mit 15 % H_2SO_4.

Versuchs-Nummer	Zuckermenge (g) in 100 ccm 15 % H_2SO_4	Kochdauer in Std.	Gelbfärbung nach Inversion	Verbrauch der Zuckerlösung (0,1 *g/dl*) in ccm	Gefundener Zuckergehalt der Lösung (in *g/dl*)	Fehler in %
1	1,0	1	++	11,03	0,09882	— 1,18
2	0,25	1	+	10,99	0,09918	— 0,82
3	0,25	1/2	—	10,93	0,09973	— 0,27
4	0,25	1/3	—	11,03	0,09882	— 1,18

Bei der einstündigen Kochdauer mit 15%iger Schwefelsäure ist die Zersetzung des Zuckers schon etwas merklich. Bei 1/2 stündiger Kochdauer ist die Inversion indessen noch unvollständig.

Wie die Ergebnisse der Tabellen I bis IV zeigen, wurden abweichend von Ost folgende Tatsachen gefunden:

1. Die Kochdauer für die vollständige Inversion des Milchzuckers kann bedeutend abgekürzt werden, wenn man eine etwas stärkere Konzentration der Säure als nach den Ostschen Angaben verwendet.

2. Für die verdünnte Lösung ist die Zersetzung des Milchzuckers bei der Inversion mit stärkerer Säure nicht zu befürchten, wenn die Kochdauer kurz ist, dagegen wirkt selbst ganz schwache Säure auf den Milchzucker stärker zersetzend ein, wenn die Kochdauer lang ist.

3. Ganz glatt und vollständig ohne jede Zersetzung verläuft die Inversion des Milchzuckers, wenn 1,0 bis 0,25 g Milchzucker mit 100 ccm 10%iger Schwefelsäure 1/2 bis 1 Stunde im Dampfbade erhitzt werden.

Inversion mit Salzsäure.

Die bisherigen Untersuchungen wurden nur mit Schwefelsäure ausgeführt. Bekanntlich ist die invertierende Fähigkeit der Säuren eine spezifische Wirkung der Wasserstoffionen. Demgemäß ist es zu erwarten, daß jede Säure eine gleiche Inversionsgeschwindigkeit besitzt, wenn sie elektrolytisch gleich stark dissoziert ist, d. h., wenn die Konzentration der Wasserstoffionen die gleiche ist.

Nach physikalisch-chemischen Untersuchungen ist die Konzentration der Wasserstoffionen der verdünnten Schwefelsäure annähernd halb so groß wie die einer gleichprozentigen Salzsäure.

Unter dieser Annahme stellte ich analoge Untersuchungen mit Salzsäure an. Die Ergebnisse derselben sind im folgenden tabellarisch verzeichnet. Zum Vergleiche sind die entsprechenden Resultate der Schwefelsäureinversionen mit in der Tabelle aufgeführt worden.

Inversion mit HCl.

Versuchs-Nummer	Konzentration der Säure in %	Zuckermenge (g) in 100 ccm der Säure	Koch-dauer in Std.	Verbrauch der Zuckerlösung (0,1 *g/dl*) in ccm	Gefundener Zuckergehalt der Lösung in *g/dl*
1	1 HCl	0,5	2	10,95	0,09954
	2 H_2SO_4	0,5	2	10,93	0,09973
2	1 HCl	0,5	1/2	13,10	0,08321
	2 H_2SO_4	0,5	1/2	12,30	0,08862
3	2,5 HCl	1,0	1	10,90	0,10000
	5 H_2SO_4	1,0	1	10,90	0,10000
4	2,5 HCl	0,5	1/2	11,35	0,09604
	5 H_2SO_4	0,5	1/2	11,47	0,09503
5	5 HCl	1,0	1	10,93	0,09973
	10 H_2SO_4	1,0	1	10,90	0,10000
6	5 HCl	1,0	1/2	10,93	0,09973
	10 H_2SO_4	1,0	1/2	10,93	0,09973
7	5 HCl	0,25	1/2	10,90	0,10000
	10 H_2SO_4	0,25	1/2	10,88	0,10018
8	7,5 HCl	1,0	1	11,40	0,09561
	15 H_2SO_4	1,0	1	11,03	0,09882
9	7,5 HCl	0,25	1/2	10,94	0,09963
	15 H_2SO_4	0,25	1/2	10,93	0,09973

Es ist beachtenswert, wie genau die invertierende Wirkung der Säuren der Konzentration der Wasserstoffionen entspricht.

Demnach steht es fest, daß man den Milchzucker mit 5%iger Salzsäure ebenso glatt und vollkommen invertieren kann wie mit 10%iger Schwefelsäure. Mit der Salzsäure geht die Inversion des Milchzuckers am leichtesten und schnellsten vor sich, wenn man 1,0 bis 0,25 g Milchzucker mit 100 ccm 5%iger Salzsäure 1/2 bis 1 Stunde im Dampfbade erhitzt.

Aus den obigen Untersuchungen geht hervor, daß sich der Milchzucker nach der Inversion mittels ammoniakalischer Kupferlösung ebenso einfach und exakt bestimmen läßt wie der Traubenzucker selbst, und ferner, daß eine vollständige Inversion des Milchzuckers mit 10%iger Schwefelsäure oder 5%iger Salz-Salzsäure innerhalb von 1/2 bis 1 Stunde ohne die geringste Zersetzung erfolgt.

Milchzuckerbestimmung in der Milch nach der neuen Inversionsmethode.

Die Methode der quantitativen Bestimmung des Milchzuckers hat selbstverständlich erst dann praktischen Wert, wenn dieselbe mit gleichem Erfolge auf die Milch selbst angewendet werden kann. Es schien uns von vornherein sehr wahrscheinlich, daß die oben beschriebene Inversionsmethode für die Milch ebenfalls richtige Resultate ergeben würde. Wegen der großen praktischen Bedeutung habe ich auch diese Frage experimentell geprüft. Für die Milch ist, wie ersichtlich, eine kleine Voroperation unerläßlich. Dieselbe besteht nämlich in einer vollständigen Entfernung von Eiweiß und Fett. Hierzu hat man das vorzügliche Verfahren von Ritthausen-Soxhlet[1]), welches für Milchanalyse überall eingeführt ist. Wenn man bei der Enteiweißung darauf besondere Aufmerksamkeit richtet, daß das zur Fällung des Eiweißes verwendete Kupfersalz durch genaue Neutralisation vollständig entfernt wird, so läßt sich der Milchzucker im Filtrate mittels unserer Inversionsmethode ebenso leicht und genau bestimmen wie in einer reinen Zuckerlösung. Das Verfahren von Ritthausen-Soxhlet zur Enteiweißung der Milch eignet sich besonders für die Fälle, wo man Milchzuckerbestimmungen in einer ganzen Anzahl von Milcharten auszuführen hat.

Als das zweite Verfahren der Enteiweißung der Milch empfehle ich ganz besonders dasjenige von K. Sutō[2]), welches sich ohne jede Vorbereitung sogleich ausführen läßt. Da dasselbe bis jetzt nur in japanischer Sprache beschrieben worden ist, so führe ich hier das Sutōsche Verfahren mit Zustimmung des Verfassers an:

„10 ccm Milch werden in einem Meßkolben von 100 ccm mit 70 bis 80 ccm Wasser verdünnt. Darauf wird 0,4 bis 0,6 ccm 36 %iger Essigsäure (1,048 D)[3]) hinzugefügt, leicht umgerührt,

---

[1]) Ritthausen-Soxhlet, Zeitschr. f. anal. Chem. 20, 436; Analyse der Milch von E. Pfeiffer, 1887, S. 26; und Chemie der Zuckerarten von v. Lippmann, 3. Aufl., II. Halbbd., S. 1579.

[2]) Sutō, Ikwagakujisshu, 2. Aufl., S. 438.

[3]) Der Zusatz der Essigsäure bezweckt eine vollständige Fällung des Caseins mitsamt dem Fette. Zu dem Zwecke muß die Menge der Essigsäure je nach den Milcharten etwas variiert werden.

mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt, gut gemischt und der Caseinniederschlag abfiltriert. Von dem Filtrate werden 50 ccm mit 10 bis 15 ccm gesättigter Kochsalzlösung versetzt und im Dampfbad gekocht. Nach dem Erkalten wird die Flüssigkeit mitsamt dem Niederschlage von Albumin und Globulin im Meßkolben auf 100 ccm aufgefüllt und abfiltriert. Das Filtrat dient zur Inversion. Die Milch ist somit aufs 20fache verdünnt."

Im folgenden führe ich einige vergleichende Zuckerbestimmungen an, welche von ein und derselben Milch nach der Enteiweißung einerseits nach der Allihn-Soxhletschen Methode gewichtsanalytisch, andererseits nach unserem Inversionsverfahren titrimetrisch ausgeführt worden sind. Die Kuhmilch wurde vor jeder Messung gut durchgeschüttelt.

Versuch I.

25 ccm Milch wurden zur Eiweißfällung nach Ritthausen-Soxhlet behandelt und auf 500 ccm aufgefüllt.

A. 100 ccm des Filtrates wurden der Allihn-Soxhletschen Gewichtsanalyse unterworfen. Die gefundene Kupfermenge betrug 335,5 mg, entsprechend 252,1 mg = 0,2521 g Milchzucker (nach der Tabelle von Soxhlet-Wein).

Da die Milch aufs 20fache verdünnt ist, so beträgt der Milchzuckergehalt der Milch $0{,}2521 \times 20 = 5{,}04\ g/dl$.

B. 50 ccm obigen Filtrates wurden mit 3,4 ccm 94 %iger Schwefelsäure (1,84 D) versetzt, damit der Säuregehalt 10 %ig wird, und ½ Stunde im Dampfbade erhitzt. Nach dem Erkalten wurde die Flüssigkeit mit 27 ccm 15 %iger Natronlauge bis zu ganz schwach saurer Reaktion neutralisiert und bei Zimmertemperatur auf 100 ccm aufgefüllt. Hierauf wurde der Zuckergehalt nach Pavy-Kumagawa-Sutō titriert. Zur Endreaktion wurden verbraucht 8,63 ccm. Demnach beträgt der Milchzuckergehalt des Filtrates nach der Inversion

$$\frac{0{,}0109 \times 100}{8{,}63} = 0{,}1263\ g/dl,$$

und somit derjenige der Milch $0{,}1263 \times 40 = 5{,}05\ g/dl$.

Versuch II.

Enteiweißung nach Ritthausen-Soxhlet wie bei Versuch I.

A. Nach Allihn-Soxhlet gewichtsanalytisch bestimmt wie bei Versuch I. A.

Die gefundene Kupfermenge betrug 333,8 mg, entsprechend 250,6 mg = 0,2506 g Zucker. Demnach beträgt der Milchzuckergehalt der Milch $0{,}2506 \times 20 = 5{,}01$ *g/dl.*

B. Inversion und Titration wie bei Versuch I. B.

Zur Endreaktion wurden verbraucht 8,65 ccm. Demnach beträgt der Zuckergehalt der Milch

$$\frac{0{,}0109 \times 100 \times 40}{8{,}65} = 5{,}04\ g/dl.$$

Versuch III.

Enteiweißung nach Ritthausen-Soxhlet wie bei Versuch I.

A. Gewichtsanalytisch nicht bestimmt.

B. Inversion und Titration wie bei Versuch I. B.

Zur Endreaktion wurden verbraucht 8,63 ccm. Demnach beträgt der Zuckergehalt der Milch

$$\frac{0{,}0109 \times 100 \times 40}{8{,}63} = 5{,}05\ g/dl.$$

Versuch IV.

20 ccm derselben Milch wurden nach Sutō enteiweißt.

A. Nach Allihn-Soxhlet gewichtsanalytisch bestimmt wie bei Versuch I. A.

Die gefundene Kupfermenge betrug 336,0 mg, entsprechend 252,5 mg = 0,2525 g Zucker. Demnach beträgt der Zuckergehalt der Milch

$$0{,}2525 \times 20 = 5{,}05\ g/dl.$$

B. Inversion und Titration wie bei Versuch I. B.

Zur Endreaktion wurden verbraucht 8,63 ccm. Demnach beträgt der Zuckergehalt der Milch

$$\frac{0,0109 \times 100 \times 40}{8,63} = 5,05\ g/dl.$$

Versuch V.

Nach Sutō entweißt wie bei Versuch IV.

A. Gewichtsanalytisch nicht bestimmt.

B. Inversion und Titration wie bei Versuch I. B.

Zur Endreaktion wurden verbraucht 8,62 ccm. Demnach beträgt der Zuckergehalt der Milch

$$\frac{0,0109 \times 100 \times 40}{8,62} = 5,06\ g/dl.$$

Versuch VI.

Nach Sutō enteiweißt wie bei Versuch IV.

A. Gewichtsanalytisch nicht bestimmt.

B. 50 ccm des Filtrates wurden mit 6,9 ccm 36⁰/₀iger Salzsäure (1,18 D) versetzt, damit der Säuregrad 5⁰/₀ig wird. Hierauf wurde die Flüssigkeit 30 Minuten lang im Dampfbade erhitzt, dann mit 18 ccm 15⁰/₀iger Natronlauge bis zu ganz schwach saurer Reaktion neutralisiert. Nach der Auffüllung auf 100 ccm wurde die Lösung nach Pavy-Kumagawa-Sutō titriert.

Zur Endreaktion wurden verbraucht 8,62 ccm. Demnach beträgt der Zuckergehalt der Milch

$$\frac{0,0109 \times 100 \times 40}{8,62} = 5,06\ g/dl.$$

Versuch VII.

Nach Sutō enteiweißt wie bei Versuch IV.

A. Gewichtsanalytisch nicht bestimmt.

B. Inversion und Titration wie bei Versuch VI. B.

Zur Endreaktion wurden verbraucht 8,65 ccm. Demnach beträgt der Zuckergehalt der Milch

$$\frac{0,0109 \times 100 \times 40}{8,65} = 5,04\ gd/l.$$

Tabellarische Übersicht der Versuche I bis VII.

Versuchs-Nummer	Art der Enteiweißung	Art der Säuren zur Inversion	Gefundener Zuckergehalt (*g*/*dl*) nach	
			Allihn-Soxhlet	Inversionsmethode
1	Ritthausen-Soxhlet	H_2SO_4 (10 %)	5,04	5,05
2	"	" "	5,01	5,04
3	"	" "	—	5,05
4	Sutō	" "	5,05	5,05
5	"	" "	—	5,06
6	"	HCl (5 %)	—	5,06
7	"	" "	—	5,04

Die Resultate der Inversionsmethode decken sich mit denen der Allihn-Soxhletschen ziemlich gut. Die letztere zeigt nach allerdings einer etwas kleinen Zahl von Untersuchungen zwischen Maximum und Minimum eine Differenz von beinahe 1 %. Die Resultate der Inversionsmethode für sich stimmen dagegen so genau überein, daß man für die analytische Methode nicht mehr verlangen kann. Die Inversionsmethode läßt sich ferner ungleich leichter und schneller ausführen als die Gewichtsanalyse. Ein großer Vorteil der neuen Methode ist außerdem noch der Umstand, daß man hier nach der Feststellung der Reduktionswerte die Zuckermenge ganz einfach berechnen kann, während man bei der Gewichtsanalyse stets der Soxhlet-Weinschen Tabelle bedarf.

Kurze Beschreibung der neuen Inversionsmethode.

25 ccm resp. 10 ccm Kuhmilch werden entweder nach Ritthausen-Soxhlet oder nach Sutō enteiweißt. 50 ccm des Filtrates der bei der Enteiweißung aufs 20 fache verdünnten Milch werden entweder mit 3,4 ccm 94 %iger Schwefelsäure (1,84 D) oder mit 6,9 ccm 36 %iger Salzsäure (1,18 D) versetzt, damit der Säuregehalt für Schwefelsäure 10 %ig, für Salzsäure 5 %ig wird. Die so angesäuerte Flüssigkeit wird in einem Becherglas im Dampfbade $^1/_2$ bis 1 Stunde gekocht. Nach dem Abkühlen wird sie bei der Schwefelsäure mit 27 ccm, bei der Salzsäure mit 18 ccm 15 %iger Natronlauge (1,17 D) bis zu ganz schwach saurer Reaktion neutralisiert und bei Zimmertemperatur

im Meßkolben mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt. Dann wird der Zuckergehalt nach Pavy-Kumagawa-Sutō titriert. Aus der verbrauchten Menge bis zur Endreaktion berechnet man den Milchzuckergehalt der Milch nach der folgenden Formel:

$$\frac{0{,}0109 \times 100 \times 40}{V} = M$$

V = Verbrauchte Menge des verdünnten Milchfiltrates bis zur Endreaktion.

M = Milchzuckergesalt der Milch in g/dl.

Zusammenfassung.

1. Die Reduktionskraft des Milchzuckers schwankt bei der direkten Titration je nach den Methoden ganz bedeutend. So verhält sich dieselbe zu der des Traubenzuckers bei der Titration mit Fehlingscher Lösung nach Soxhlet wie 74:100, bei der Titration mit der ursprünglichen Pavyschen Ammoniak-Kupferlösung nach Pavy wie 60:100, und bei der Titration mit der von Kumagawa-Sutō modifizierten Pavyschen Lösung nach meinen Angaben wie 56,5:100.

Zur Erzielung der Endreaktion müssen ferner bei allen genannten Methoden mehrere Titrationen systematisch ausprobiert werden. Aus diesen Gründen sind die Methoden der direkten Titration des Milchzuckers ganz minderwertig. Dagegen läßt sich der Milchzucker nach der Inversion ebenso glatt und exakt titrieren wie der Traubenzucker.

2. 0,01179 g reiner d-Galactose und ebenso 0,0109 g eines Gemenges gleicher Teile von d-Glucose und d-Galactose haben für die Pavy-Kumagawa-Sutōsche Kupferlösung genau dieselbe Reduktionskraft wie 0,01 g reine d-Glucose. Demnach verhält sich die Reduktionskraft von d-Galactose zu der von d-Glucose wie 84,8:100, und die des Gemenges von d-Glucose und d-Galactose nach gleichen Teilen zu der von d-Glucose wie 91,7:100.

Da die Reduktionskraft des Milchzuckers ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$) nach der Inversion ebenfalls genau das letzte Verhältnis beibehält, so stellte ich für die Titration mittels ammoniakalischer Kupferlösung nach Pavy-Kumagawa-Sutō fest, daß 0,0109 g Milchzucker 0,01 g Traubenzucker entsprechen.

3. Wenn ein Gemenge von 0,1 g d-Glucose und 0,1 g d-Galactose in 100 ccm 10 %iger Schwefelsäure 1/2 bis 1 Stunde im Dampfbade (100 ° C) erhitzt wird, so bleibt der Zucker vollkommen intakt. Weder die Farbe noch die Reduktionskraft der Flüssigkeit wird hierdurch geändert.

4. Nach Ost hat man allgemein angenommen, daß die vollständige Inversion des Milchzuckers durch Säurekochung mindestens 4 Stunden erfordert. Hiergegen ist von mir festgestellt worden, daß der Milchzucker bei einer Kochdauer von 1/2 bis 1 Stunde ohne jede Zersetzung vollkommen invertiert werden kann, wenn man 1,0 bis 0,25 g Milchzucker mit 100 ccm 10 %iger Schwefelsäure oder 5 %iger Salzsäure im Dampfbade erhitzt. Entgegen der bisherigen Annahme ist demnach die Zersetzung des Milchzuckers bei der Inversion durch stärkere Säure nicht zu befürchten, wenn die Kochdauer kurz ist.

5. Die invertierende Wirkung der Säuren entspricht der Konzentration der Wasserstoffionen. Demnach wirkt 5 %ige Salzsäure bei der Inversion des Milchzuckers ebenso stark wie 10 %ige Schwefelsäure.

6. Die Lactose läßt sich nach der Inversion mittels der Pavy-Kumagawa-Sutōschen Titriermethode sowohl in reiner Lösung als in der Milch ebenso leicht und genau bestimmen wie der Traubenzucker. Die Resultate der Analyse stimmen dabei mit denen der Allihn-Soxhletschen Gewichtsermittelung gut überein. Was als besonderer Vorzug des neuen Inversionsverfahrens angesprochen werden darf, ist, daß sich dasselbe ungleich leichter und schneller und ebenso exakt ausführen läßt wie die Gewichtsanalyse, und ferner, daß die Zuckermenge nach der Feststellung der Endreaktion sich nach der angeführten Formel ganz einfach berechnen läßt, während man bei der Gewichtsanalyse stets einer empirischen Tabelle bedarf.

Über den Abbau der Acetessigsäure im Tierkörper.

II. Mitteilung.

Von

Gustav Embden und Louis Michaud.

(Aus dem chemisch-physiologischen Institut und der medizinischen Klinik der städtischen Krankenanstalten zu Frankfurt a. M.

(Eingegangen am 30. August 1908.)

Vor kurzem haben wir gezeigt,[1]) daß lebensfrische Organe die Fähigkeit haben, bei Körpertemperatur zugesetzte Acetessigsäure rasch derartig zu verändern, daß sie sich dem Nachweis entzieht. Ebenso wurde auch Aceton durch frischen Organbrei, wenn auch erheblich schwächer als Acetessigsäure, zum Verschwinden gebracht.

Da es unseres Erachtens keinem Zweifel unterliegen kann, daß die Acetessigsäure ein in sehr reichlicher Menge auftretendes normales intermediäres Stoffwechselprodukt ist, und da ferner im normalen Harn nur ganz geringe Spuren der eben genannten Substanz, im Harn von zuckerkranken Menschen und Tieren dagegen oft sehr reichliche Mengen sich vorfinden, so ergab sich nunmehr die Frage, ob dieser Unterschied im Verhalten des normalen und diabetischen Organismus auf eine Vermehrung der Acetessigsäurebildung oder aber auf eine Verminderung des Acetessigsäureabbaus im Organismus zurückzuführen sei.

Unter der Voraussetzung, daß die von uns beobachtete Acetessigsäurezerstörung durch die Leber einem auch im lebenden Organismus sich vollziehenden Prozeß entspricht, glaubten

[1]) G. Embden und L. Michaud, Über den Abbau der Acetessigsäure im Tierkörper. I. Mitteilung. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **11**, 332, 1908.

wir, die eben aufgeworfene Frage an der lebensfrischen Leber pankreasloser Hunde entscheiden zu können.

Die Versuche wurden an vier pankreaslosen Hunden ausgeführt, und zwar bei dreien (Versuch 1, 2, 4) 3 Tage, bei dem vierten (Versuch 3) 4 Tage nach der totalen Pankreasexstirpation.

Wir haben absichtlich für unsere Versuche gerade die Leber und gerade den erwähnten Zeitpunkt nach der Pankreasexstirpation gewählt, weil nach kürzlich veröffentlichten Untersuchungen von Embden und Lattes[1]) die künstlich mit normalem Blut durchblutete Leber 3 bis 4 Tage nach der Pankreasexstirpation ganz regelmäßig weit größere Mengen Acetessigsäure als die normale unter gleichen Versuchsbedingungen entstehen läßt. Die Änderung im intermediären Stoffwechsel ist also mit Sicherheit um diese Zeit schon ausgebildet und in der Leber lokalisiert.[2])

Da der Umfang und Verlauf der Acetessigsäurezerstörung durch die lebensfrische Leber teilweise von Umständen abhängig ist, die wir noch nicht völlig übersehen, so haben wir neben der Untersuchung der vom pankreaslosen Hunde stammenden Leber in ganz gleicher Weise eine solche der Leber vom normalen Hunde angestellt, um so unmittelbare Vergleichswerte zwischen dem Verhalten der diabetischen und der normalen Leber zu erhalten.

Unsere pankreaslosen Hunde hatten vor der Operation 24 bis 48 Stunden, zum Teil auch länger gehungert und erhielten auch nach der Operation keinerlei Nahrung. Als Kontrollhunde haben wir daher ebenfalls Hungertiere von möglichst ähnlichem Körpergewicht gewählt. Die Dauer des Hungers war allerdings bei letzteren zum Teil geringer als bei den pankreaslosen Tieren. Das größte Gewicht wurde nach den früher von uns gemachten Erfahrungen darauf gelegt, daß vom Moment der Tötung des Tieres durch Entbluten in leichter Äthernarkose bis zum Ansetzen der Versuche eine möglichst geringe Zeit verlief.

---

[1]) G. Embden und L. Lattes, Über die Acetessigsäurebildung in der Leber des diabetischen Hundes. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 11, 327, 1908.

[2]) Hiermit soll nicht gesagt sein, daß nicht auch andere Organe als die Leber bei dieser Störung beteiligt seien.

Der Leberbrei wurde wie in einem Teil unserer früheren Versuche mit der mehrfachen Menge auf 40° C erwärmter Kochsalzlösung von 0,85 % versetzt. Zu allen Einzelversuchen wurde die gleiche Menge derselben Lösung von acetessigsaurem Natron hinzugefügt und der Gehalt an Acetessigsäure unmittelbar nach dem Zusatze, sowie nach 30 und 60 Minuten langem Stehen in einem Wasserbade von 40° C bestimmt.

Um die verschiedenen Versuche auch untereinander vergleichen zu können, haben wir in allen Fällen ähnliche Mengen von acetessigsaurem Natron zugesetzt.

Die Acetessigsäurelösung wurde für jeden Versuch durch Verseifen von Acetessigester in der in unserer früheren Arbeit geschilderten Weise frisch hergestellt.

Bezüglich aller weiteren Einzelheiten der Versuchsanordnung können wir ganz auf unsere frühere Mitteilung sowie auf die nebenstehenden Tabellen verweisen.

Hier sei nur noch hervorgehoben, daß nach der Totalexstirpation des Pankreas bei unseren Hunden keine oder doch nur ganz geringfügige Temperatursteigerungen auftreten, die (Versuch 2 und 3) auf oberflächliche Bauchdeckenabscesse zurückzuführen waren, während die Abdominalorgane nie entzündliche Erscheinungen aufwiesen.

In allen Fällen war die Leber klein und hochgradig verfettet.

Über den Verlauf der Zucker- und der Acetessigsäureausscheidung, der quantitativ verfolgt wurde, wollen wir hier im einzelnen nicht berichten.

Die Leberversuche sind in Tabelle I zusammengestellt. Die Kolonnen 2 bis 5 beziehen sich auf die Leber der pankreaslosen Hunde, aus Kolonne 3, 4 und 5 ist die Acetessigsäuremenge sofort nach dem Ansetzen des Versuchs, sowie nach 30 und 60 Min. langem Stehen bei 40° C ersichtlich. Die entsprechenden Angaben für die Leber der normalen Hunde finden sich in den Kolonnen 7 bis 9.

In Kolonne 10 und 11 ist die Abnahme der Acetessigsäure nach einstündigem Stehen in Milligramm, in Kolonne 12 und 13 in Prozenten der am Anfang des Versuches vorhandenen Acetessigsäuremenge berechnet.

Ein Blick auf die Tabelle lehrt, daß ein wesentlicher

Unterschied im Verhalten der Leber des pankreaslosen und des normalen Hundes nicht vorhanden ist.

In Versuch 1 ist die Abnahme in der Leber des pankreaslosen Hundes merklich stärker als in der des normalen.

In den übrigen Versuchen sind die Abnahmewerte für die Leber des diabetischen und des normalen Hundes überaus ähnliche. Jedenfalls kann von einer Verminderung der Acetessigsäure zerstörenden Funktion in der diabetischen Leber bei unserer Versuchsanordnung keine Rede sein.

Wir möchten noch die Aufmerksamkeit auf die Ähnlichkeit der Einzelheiten der Abnahmekurve bei den diabetischen und den normalen Tieren hinlenken.

Ganz kurz seien nur noch zwei Versuche erwähnt, die wir am

Tabelle I.

Versuchs-Nr.	Pankreasloser Hund				Kontrollhund				Abnahme			
	Versuchsanordnung	Acetessigsäure in mg			Versuchsanordnung	Acetessigsäure in mg			in mg		in % des Anfangswertes	
		sofort	nach 30 Min.	nach 60 Min.		sofort	nach 30 Min.	nach 60 Min.	Pankreasloser Hund	Kontroll-Hund	Pankreasloser Hund	Kontroll-Hund
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	40 g Leberbrei, 100 ccm NaCl-Lösung (1:2,5)	119	70	60	Wie in Kol. 2	108	83	74	59	34	49,6	31,5
2	30 g Leberbrei, 100 ccm NaCl-Lösung (1:3,3)	99	79	64	Wie in Kol. 2	97	81	65	35	32	35,3	32,9
3	30 g Leberbrei, 100 ccm NaCl-Lösung (1:3,3)	120	101	90	Wie in Kol. 2	116	91	82	30	34	25,0	29,3
4	30 g Leberbrei, 100 ccm NaCl-Lösung (1:3,3)	131	106	94	Wie in Kol. 2	132	104	90	37	42	28,2	31,8

Tabelle II.

Versuchs-Nr.	Pankreasloser Hund				Abnahme	
	Versuchsanordnung	Acetessigsäure in mg			in mg	in % des Anfangswertes
		sofort	nach 15 Min.	nach 45 Min.		
1	2	3	4	5	6	7
5	50 g Muskelbrei, 100 ccm NaCl-Lösung (1:2)	125	108	101	24	19,2
6	50 g Muskelbrei, 100 ccm NaCl-Lösung (1:2)	92	84	67	25	27,1

Muskelfleisch zweier weiterer pankreasloser Hunde anstellten. (Vgl. Tabelle II.)

Die Anordnung der Tabelle dürfte ohne weiteres verständlich sein. Aus den Zahlenangaben in den Kolonnen 3 bis 7 geht hervor, daß auch die Muskulatur des pankreaslosen Hundes die Fähigkeit der Acetessigsäurezerstörung nicht verloren hat. Vergleichende Untersuchungen über das Verhalten des Muskelfleisches von diabetischen und normalen Tieren wurden nicht besonders angestellt. Es war aber jedenfalls die Abnahme der Acetessigsäure nicht geringer als in unseren früheren Normalversuchen.

Als das wesentlichste Ergebnis der vorliegenden Untersuchung möchten wir die Tatsache bezeichnen, daß die Fähigkeit der lebensfrischen Leber (und auch der Muskulatur), Acetessigsäure zum Verschwinden zu bringen, beim pankreaslosen Hunde gegenüber der Norm nicht vermindert ist.

Unter der Voraussetzung, daß die von uns unter dem Einfluß lebensfrischer Organe beobachtete Acetessigsäureabnahme dem vitalen Acetessigsäureabbau entspricht, ist sonach die vermehrte Ausscheidung der Acetessigsäure im diabetischen Organismus nicht durch einen verminderten Abbau, sondern vielmehr durch eine vermehrte Bildung dieses normalen intermediären Stoffwechselproduktes bedingt.

Über den Einfluß stickstofffreier Energieträger auf den zeitlichen Ablauf der Eiweißzersetzung.

Von

W. Falta, Wien und A. Gigon, Basel.

(Aus der Medizinischen Klinik in Basel.)

(Eingegangen am 18. August 1908.)

Wenn ein Tier hungert, so schmelzen seine Glykogenvorräte bekanntlich zuerst rasch ab, die der Leber rascher als die der Muskel; die letzten Reste können aber nur schwer zum Verschwinden gebracht werden. Der Organismus hält diesen letzten Bestand an Kohlenhydraten zäh fest, woraus wohl geschlossen werden darf, daß ein Minimum von Kohlenhydraten für den normalen Ablauf der Zersetzungsprozesse unbedingt notwendig ist. In der bekannten eiweißsparenden Wirkung der Kohlenhydrate, welche die aller anderen stickstofffreien Energieträger bei weitem übertrifft, liegt ja ebenfalls ein Hinweis, daß dort, wo reichlich Kohlenhydrat zersetzt wird, die Zellen unter größerer Schonung ihres Eiweißbestandes arbeiten können. Ein durch Hunger an Glykogen stark verarmter Organismus wird daher das Bestreben haben, seine Glykogendepots wieder zu füllen, um wieder für längere Zeit mit dem kostbaren Material versorgt zu sein. Es ist so zu erwarten, daß bei Fütterung von Fleisch und Kohlenhydrat in einem an Glykogen verarmten Organismus die Zersetzungen anders ablaufen werden als unter normalen Verhältnissen.

Die älteren Untersuchungen von E. Voit und Korkunoff[1])

---

[1]) E. Voit und Korkunoff, Zeitschr. f. Biol. 32, 1895.

geben hierfür schon einen genügenden Anhaltspunkt. **Wenn nach 3 bis 5 tägigem Hunger einige Tage hindurch Fleisch + Stärke gereicht werden, sinkt die N-Ausscheidung vom ersten bis zum dritten Fütterungstage, was darauf hinweist, daß der Einfluß der Stärkezufuhr auf dem Eiweißzerfall erst an diesem Tage zum vollen Ausdrucke kommt. Eine solche Senkung der N-Ausscheidung wurde bei Fütterung mit Fleisch + Fett nie bemerkt.**

Es war daher auch zu erwarten, daß bei voller Kost starke Unterschiede im zeitlichen Ablauf der Zersetzungen eintreten würden, je nachdem diese nach kürzerem oder längerem Hunger gereicht wurde. Wir bringen hier in aller Kürze einige Versuche dieser Art.

Sämtliche Versuchshunde waren annähernd gleich schwer, ziemlich groß und mager. Das Gewicht der Hunde betrug 21,5 bis 22,5 Kilo.

Die Hunde erhielten vor dem Versuch durch mehrere Tage hindurch eine Standardkost, bestehend aus 200 g Pferdefleisch, 150 g Reis und 80 g Schmalz. Die Hungerperioden sind von der letzten Fütterung an gerechnet. In den Versuchen wurde durchweg fettärmstes Pferdefleisch verfüttert, dessen N-Gehalt zwischen 3,1 bis 3,3% betrug. Es wurden also ca. 22 g N verfüttert. Die Lävulose (von Schering, Berlin) wurde ausnahmslos gut vertragen. Der Kot war auch während der Lävuloseperioden geformt; der Stickstoffgehalt derselben betrug während der Hunger- + Fütterungsperiode zwischen 1 und 2 g. Der Inosit wurde uns von der Gesellschaft für chemische Industrie in Basel in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt. Er war aus Phytin gewonnen. In einem Versuche untersuchten wir Kot und Harn auf Inosit. Aus dem Harn konnte ca. 1 g Inosit dargestellt werden; im Kot ließen sich größere Mengen nicht nachweisen. Daß der Inosit zum größten Teile verbrannte, geht schon aus seiner starken Wirkung auf die Eiweißzersetzung hervor.

In dem Alkoholversuch geriet das Tier nach der Verfütterung in einen stark berauschten Zustand, konnte sich kaum auf den Beinen halten und zeigte Krämpfe. Nach 3 bis 4 Stunden war der Zustand wieder normal.

A. Versuche mit Fleisch.

Nahrung	Nr. des Versuchs	Nr. des Hundes	Hungert seit Stunden	N-Ausscheidung in Prozent der Einfuhr			
				12	24	36	48
				Stunden nach der Fütterung			
690 Fleisch	3	I	48	54,5	73,0	85,7	—
690 „	7	II	72	58,4	80,3	91,2	103,1
690 „	8	III	108	65,7	86,3	100,0	—
B. Versuche mit Fleisch und Lävulose.							
690 Fleisch, 200 Lävulose	1	II	36	29,9	62,1	78,6	—
690 Fleisch, 200 Lävulose	4	I	48	44,4	71,9	82,9	—
690 Fleisch, 200 Lävulose	9	I	108	51,0	88,1	104,7	—
C. Versuche mit Fleisch und Inosit.							
690 Fleisch, 80 Inosit .	6	I	48	35,2	76,3	90,9	—
690 Fleisch, 80 Inosit .	12	III	180	33,0	86,4	100,0	—
690 Fleisch, 34 Inosit .	13	IV	108	52,6	—	—	—
D. Versuch mit Fleisch und Alkohol.							
690 Fleisch, 60 Alkohol.	15	V	108	64,0	92,4	107,3	—

Das Resultat dieser Untersuchungen läßt sich in folgenden Sätzen zusammenfassen:

A. Mit der Dauer des vorangegangenen Hungerzustandes nimmt die Schnelligkeit der Zersetzung verfütterten Eiweißes zu.

B. Mit der Dauer des vorangegangenen Hungers nimmt die eiweißsparende Wirkung von Kohlenhydraten, die gleichzeitig mit dem Fleisch gereicht werden, ab.

C. Der Inosit drängt die Eiweißzersetzung nur in den ersten 12 Stunden stark zurück. Die Dauer des vorangegangenen Hungers hat auf diese Wirkung des Inosits keinen Einfluß.

D. Durch den Alkohol tritt eher eine Beschleunigung der Eiweißzersetzung ein (vgl. Versuch 8 mit Versuch 15).

Hierzu ist noch folgendes zu bemerken: Die Wirkung des Inosits in Versuch 6 und 12 ist um so höher zu bewerten, da nur 80 g Inosit, also viel weniger Calorien eingeführt wurden als in den Versuchen mit Lävulose.

Auch der Versuch 13 stimmt mit den beiden anderen Versuchen überein. Hier wurden nur 34 g Inosit mit dem Fleisch gereicht. Diese wirkten in den ersten 12 Stunden ebenso stark auf die Eiweißzersetzung wie ceteris paribus 200 g Lävulose (vgl. Versuch 13 mit Versuch 9).

In einem nicht mit in die Tabelle aufgenommenen Versuch (5) wurde statt 200 g Lävulose 200 g Weizenmehl verfüttert. Die Versuchsbedingungen waren sonst genau dieselben wie im Versuch 4. Die Stickstoffkurve verlief etwas schneller abwärts als im Versuch 4, was darauf zurückzuführen ist, daß in 200 g Weizenmehl nur ca. 150 g Kohlenhydrate enthalten sind. Da auch Rohrzucker, wie aus den nachstehenden Versuchen von Pari hervorgeht, sich gleich verhält, so können wir also von einer Wirkung der Kohlenhydrate im allgemeinen sprechen.

Das Resultat des Alkoholversuches scheint in Widerspruch zu stehen mit der bekannten Anschauung,[1]) daß dem Alkohol eine eiweißsparende Wirkung zukommt. Es ist aber zu bedenken, daß wir eine verhältnismäßig sehr große Alkoholmenge einführten, und es ist wohl anzunehmen, daß durch die schwere Vergiftung ein toxischer Eiweißzerfall erzeugt wurde.

Wenn wir von dem Alkoholversuch absehen, so können wir nun folgende Erklärung für die mitgeteilten Beobachtungen versuchen. Die Beschleunigung der Eiweißzersetzung im Hunger ist auf die zunehmende Erschöpfung der Glykogendepots zurückzuführen. Während unter gewöhnlichen Verhältnissen die ganze stickstofffreie Energie des Eiweißes ausgenützt wird, stapeln nach längerem Hunger die glykogenbedürftigen Zellen den durch Eiweißumsatz entstehenden Zucker als Glykogen auf, welches möglichst lange zurückgehalten wird. Dadurch muß die Eiweißzersetzung beschleunigt werden. Als Stütze für diese Ansicht

[1]) Vgl. Magnus-Levy in v. Noordens Handb. d. Pathol. d. Stoffw., 2. Aufl., 1, 377, 1907.

kann der Versuch Mohrs[2]) herangezogen werden, welcher fand, daß sich bei glykogenfreien Hungertieren zwischen der 8. und 12. Stunde nach Fütterung mit Fleisch ein beträchtlicher Gehalt der Leber und auch der Muskeln an Glykogen nachweisen läßt, welcher später wieder abschmilzt. Es ist natürlich zu erwarten, daß, wenn nun in unseren Versuchen die Fütterung mit Fleisch fortgesetzt würde und die Zellen ihren notwendigsten Bedarf an Glykogen gedeckt hätten, die Eiweißzersetzung wieder einen normalen Verlauf zeigen würde.

Wird nun nach längerem Hunger mit dem Fleisch gleichzeitig auch Kohlenhydrat gereicht, wie wir es in Versuchsreihe B getan haben, so dürften wohl dieselben Verhältnisse, nur in viel größerem Maßstabe, vorliegen. Auch hier ist wie in den Versuchen von Voit und Korkunoff anzunehmen, daß die glykogenbedürftigen Zellen mit großer Energie das Kohlenhydrat an sich reißen, wodurch dessen eiweißsparende Wirkung vorübergehend eingeschränkt, ja sogar nahezu aufgehoben wird. Auch hier ist natürlich zu erwarten, daß bei länger fortgesetzter Zufuhr die Wirkung der Kohlenhydrate wieder voll zum Ausdruck kommt.

Ganz anders liegen nun die Verhältnisse, wenn wir statt des Kohlenhydrates einen stickstofffreien Energieträger verwenden, der nicht Glykogenbildner ist. Ein solcher verpufft im Organismus sehr rasch, und drängt dadurch in der ersten Zeit die Eiweißzersetzung stärker zurück, als selbst die Kohlenhydrate dies tun. Es ist für diese Wirkung ganz gleichgültig, ob die Glykogendepots des Körpers gefüllt oder erschöpft sind. So sehen wir in den Versuchen 6 und 12 mit je 80 g Inosit nach 48stündigem und nach 180stündigem Hunger genau dieselbe Wirkung auf die Eiweißzersetzung.

Wir können also das Resultat der Untersuchungen dahin zusammenfassen, daß der Kohlenhydratbestand des Organismus für den zeitlichen Ablauf der Zersetzungen von großer Bedeutung ist.

Als Anhang möchten wir einige Versuche mitteilen, die zeigen, welchen großen Einfluß die Zusammensetzung der Standardkost auf den zeitlichen Ablauf der Zersetzungen in Superpositionsversuchen ausübt.

---

[2]) L. Mohr, Untersuchungen über den Diabetes mell. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 4, 1907.

Nr. des Versuchs	Nr. des Hundes	Standardkost	N-Gehalt	Gesamt-Cal.	Superposition	Von dem superponierten N erschienen nach 8 Stunden Prozent:	16	24	32	36	40	48	72
16	III	200 Fleisch, 250 Hundekuchen .	15,47	1324	2 × 40 Casein	15,0	48,4	72,5	81,0	—	92,0	94,7	100,6
16	III	250 Fleisch, 250 Hundekuchen .	17,27	1394	2 × 40 Casein 2 × 40 Amyl. solub.	—	25,8	48,1	59,2	—	60,0	75,8	95,1
18	III	200 Fleisch, 250 Reis, 40 Schmalz .	9,40	1520	2 × 40 Casein 2 × 40 Dextrose	10,6	—	29,8	37,1	—	—	46,2	—
19	IV	200 Fleisch, 126 Schmalz	6,40	1411	2 × 40 Casein 2 × 18 Fett	27,8	59,0	70,0	—	90,0	—	—	—

Die gleich schweren Versuchshunde wurden durch wenigstens 4 Tage auf der in der Tabelle angegebenen Standardkost gehalten, und dann an einem Tage Casein resp. Casein + Kohlenhydrat, resp. Casein + Fett in zwei gleichen Portionen um 7 Uhr morgens und 3 Uhr nachmittags superponiert. In allen Versuchen bestand in der Vorperiode N-Gleichgewicht.

In Versuch 16 und 17 ist die Standardkost fast gleich zusammengesetzt. Wir sehen, wie die Zulage von Amylum die Superpositionskurve wesentlich streckt.

In Versuch 17 und 18 nun ist das superponierte Material gleichartig (da ein Unterschied in der Wirkung auf den Eiweißumsatz durch Amylum und Dextrose, wie die vorher mitgeteilten Versuche ergeben haben, nicht besteht). Hingegen ist die Standardkost

sehr verschieden zusammengesetzt, denn im Versuch 17 kommen auf ca. 1400 Calorien 17,27 g N, im Versuch 18 aber auf 1520 Calorien 9,4 g N.

Im Versuch 18 verläuft nun die Superpositionskurve wesentlich gestreckter als im Versuch 17, es wirken also auch die in der Standardkost enthaltenen Kohlenhydrate auf den superponierten Stickstoff ein.

Ganz verschieden davon ist das Resultat des Versuchs 19. Hier war die N-freie Energie durch Fett vertreten. Obwohl hier nun die Eiweißcalorien gegenüber den N-freien Energien noch etwas mehr wie im Versuch 18 zurücktreten, so sehen wir hier die Zersetzung des superponierten Eiweißes sich um mehr als das doppelte schneller vollziehen, ja die N-Kurve läuft hier sogar etwas schneller ab als im Versuch 16, bei dem nur Casein superponiert wurde, die Standardkost aber mit dem Hundekuchen Kohlenhydrate enthielt.

Die Versuche zeigen hiermit:

I. als technisches Detail, daß die Zusammensetzung der Standardkost auf den zeitlichen Verlauf der Zersetzungen in Superpositionsversuchen von ausschlaggebender Bedeutung sein kann, und

II. daß auch beim Hunde Eiweißansatz nur durch Kohlenhydrate, nicht aber durch Fett allein zu erreichen ist.

Über den Einfluß stickstofffreier Energieträger auf den zeitlichen Ablauf der Eiweißzersetzung.

Von

G. A. Pari, Padua.

(Aus der I. Medizinischen Universitätsklinik in Wien.)

(Eingegangen am 18. August 1908.)

In der voranstehenden Mitteilung haben W. Falta und A. Gigon[1]) gezeigt, daß die Verlangsamung der Eiweißzersetzung durch Kohlenhydrate bei Hunden ausbleibt, wenn die Tiere vorher längere Zeit gehungert haben, während die Wirkung anderer nichtkohlenhydratartiger, stickstofffreier Energieträger (Inosit) auch nach längerem Hunger ganz gleich bleibt. Falta und Gigon erklärten diese Erscheinung übereinstimmend mit Voit und Korkunoff in der Weise, daß nach längerem Hunger die glykogenhungrigen Zellen die Kohlenhydrate mit großer Kraft an sich reißen und so weniger rasch in die Zersetzung gelangen lassen als unter normalen Verhältnissen, während nicht glykogenbildende Substanzen, wie der Inosit — ähnlich verhalten sich wohl auch Pflanzensäuren, kleinere Mengen von Alkohol usw. —, auch im Hunger rasch in die Zersetzung eingezogen werden, weil sie im Organismus nicht aufgespeichert werden können. Es war daher von Interesse, auch das Fett in den Kreis des Untersuchung zu ziehen, da dieses zwar kein Glykogenbildner ist, vom Organismus aber in hohem Grade gespeichert werden kann, um so mehr als Voit und Korkunoff[2]) gefunden haben, daß, wenn nach längerem Hunger Fleisch + Fett verfüttert werden, die N-Ausscheidung in den ersten Fütterungstagen ungefähr gleich bleibt. Auf Ver-

[1]) W. Falta und A. Gigon, diese Zeitschr. 13, 267, 1908.

[2]) E. Voit und A. Korkunoff, Über die geringste zur Erhaltung des Stickstoffgleichgewichts nötige Menge von Eiweiß, Zeitschr. f. Biol. 32, 1895.

anlassung von Privatdozent Falta habe ich solche Versuche angestellt.

Die Versuchshunde Nr. II und Nr. III waren nahezu gleich groß. Nr. II wog 14, Nr. III 12 kg. Beide waren eher mager. Hund I war größer, wog 20 kg und war mager.

Vor jedem Versuch erhielten die Hunde II und III durch 4 Tage eine Standardkost, bestehend aus 700 g möglichst fettarmen Pferdefleisches, dessen N-Gehalt 3,1 bis 3,3% betrug. Die Hunde erhielten also täglich ca. 22,5 g N. Die Standardkost für den Hund Nr. I bestand aus 900 g Pferdefleisch, mit einem N-Gehalt von 28,8 g. Die Nahrung wurde immer um 7 Uhr früh nach dem Katheterisieren gereicht und von den Hunden sofort verzehrt. Die Hungerperioden sind von der Stunde der letzten Fütterung an gerechnet. Rohrzucker und Schmalz wurden immer gut vertragen; der Kot blieb auch während der betreffenden Perioden geformt, so daß eine ungestörte Resorption anzunehmen ist.

Tabelle 1.

Versuche an den Hunden II und III.
(Körpergewicht 12 bis 14 kg.)

Nr. des Versuches	Nr. des Hundes	Hungert seit Stunden	Nahrung g	N-Ausscheidung in Proz. der Einfuhr 8	16	24	32	40	48 Stunden nach der Fütterung
1	III	24	700 Pferdefleisch	32,5	68,5	85,0	—	—	—
2	II	24	700 "	36,6	70,4	87,9	—	—	—
3	III	72	700 "	19,6	50,1	71,6	81,2	88,4	94,8
4	II	24	700 Pferdefleisch, 180 Rohrzucker	9,5	44,3	67,8	84,3	99,0	102,5
5	III	72	"	17,1	52,3	83,4	89,5	—	97,3
6	III	24	700 Pferdefleisch, 85 Schmalz	20,6	—	71,8	—	—	106,1
7	III	72	"	10,3	—	58,8	—	—	87,4
8	III	72	"	10,7	—	57,5	—	—	87,2
Versuche am Hund I. (Körpergewicht 20 kg.)									
9	I	72	700 Pferdefleisch	19,2	49,4	70,1	80,5	87,8	95,6
10	I	72	700 Pferdefleisch, 85 Schmalz	6,3	24,1	53,5	67,7	78,2	85,0

Überblicken wir die angeführten Versuche, so scheinen die Versuche 1, 2 und 3 in Widerspruch zu stehen mit der von Falta

und Gigon in der voranstehenden Mitteilung angegebenen Tatsache, daß bei Fütterung mit Fleisch allein die Eiweißzersetzung um so schneller abläuft, je länger die Tiere vorher gehungert haben. Ich finde nun, daß in den beiden Versuchen 1 und 2 nach 24stündigem Hunger die Eiweißzersetzung rascher abläuft als im Versuch 3 nach 72stündigem Hunger. In meinen Versuchen ist aber die Versuchsanordnung eine ganz andere als in den Versuchen von Falta und Gigon, da in den Versuchen 1 und 2 eine eigentliche Hungerperiode gar nicht vorangegangen ist und hier die Stickstoffausscheidung noch unter dem Einfluß der vortägigen Fütterung steht.

Vergleichen wir nun die Versuche mit Fleisch + Rohrzucker mit den entsprechenden Versuchen mit Fleische allein. So finden wir die Angabe von Falta und Gigon bestätigt. In dem Versuch 4 finden wir unter dem Einfluß des Rohrzuckers die Eiweißzersetzung gegenüber Versuch 1 und 2 hochgradig verlangsamt. In der ersten 8stündigen Periode werden nur 9,5% des eingeführten Stickstoffs gegenüber durchschnittlich 34% in Versuchen 1 und 2 ausgeschieden; in der zweiten 8stündigen Periode 44,3 gegenüber durchschnittlich 69,5; in der dritten 8stündigen Periode nur 67,8 gegenüber 86,5. Vergleichen wir hingegen den Versuch 5 (Fleisch + Rohrzucker) mit dem Versuch 3 (Fleisch allein), die beide nach 72stündigem Hunger ausgeführt wurden, so sehen wir nur in der ersten 8stündigen Periode ein minimales Zurückbleiben der N-Ausscheidung — die Differenz fällt wohl noch in den Fehlergrenzen der Versuchsanordnung —; in der zweiten 8stündigen Periode ist die N-Ausscheidung im Versuch 5 schon etwas größer, und in der dritten und vierten 8stündigen Periode ist die des Versuches 3 deutlich überholt. Die Eiweißzersetzung verläuft also in dem Versuch mit Rohrzucker sogar etwas schneller als in dem mit Fleisch allein. Da in meinen Versuchen Rohrzucker, in denen von Falta und Gigon Lävulose, resp. einmal Weizenmehl verwendet wurde, so wird dadurch der Einwand, daß ein besonderes Verhalten der Lävulose vorläge, völlig entkräftet.

Betrachten wir nun die Versuche mit Fett. Im Versuch 6, mit Fleisch + Fett, nach 24stündigem Hunger, sehen wir die Eiweißzersetzung gegenüber den entsprechenden Versuchen 1 und 2, mit Fleisch allein, stark verlangsamt, doch ist die Verlang-

samung, wenigstens in der ersten Zeit, geringer als in dem Versuch 4 mit Fleisch + Rohrzucker. Fett und Zuckerzulage haben denselben Caloriengehalt. Das Fett schränkt also, wie allgemein bekannt, die Eiweißzersetzung weniger ein als Kohlenhydrat. Vergleichen wir hingegen Versuch 7 und 8 mit Fleisch + Fett nach 72stündigem Hunger mit dem entsprechenden Versuch 5 (Fleisch + Rohrzucker), so sehen wir in den Fettversuchen eine hochgradige Verlangsamung der Eiweißzersetzung, während diese im Versuch mit Kohlenhydrat ausbleibt. Es geht daraus hervor, daß das Fett auch von dem hungernden, fettverarmten Tier sehr rasch in der Zersetzung eingezogen wird. Dadurch wird die Deutung, welche für das Verhalten der Kohlenhydrate im Hunger gegeben wurde, gestützt. Genau dasselbe Resultat zeigen auch die Versuche an dem größeren Hund I. Auch hier findet durch Fettzulage nach 72stündigem Hunger eine hochgradige Verlangsamung der Eiweißzersetzung statt.

Versuche mit β-Oxybuttersäure.

Von anderen N-freien Energieträgern habe ich noch die β-Oxybuttersäure untersucht. Derartige Versuche, welche den Einfluß der β-Oxybuttersäure auf den zeitlichen Ablauf der Eiweißzersetzung zum Gegenstand haben, liegen bisher in der Literatur nicht vor. Es war zu erwarten, daß sich diese Substanz in gleicher Weise wie die anderen nicht kohlenhydratartigen N-freien Energieträger verhalten wird. Die folgenden Untersuchungen haben diese Erwartung bestätigt.

Ich verwendete zu diesen Versuchen die Hunde I und III. Die Anordnung der Versuche war genau dieselbe. Die β-Oxybuttersäure (racemisch — von Merck) wurde mit Na_2CO_3 nahezu neutralisiert, mit physiologischer Kochsalzlösung stark verdünnt (über Verdünnung siehe Tabelle) und an mehreren Stellen subcutan injiziert. Bei beiden Hunden stellten sich am Tage nach der Injektion leichte Temperatursteigerungen ein. Beim Hund I stieg die Temperatur von 38,5° auf 39,6°, beim Hund III von 38,5° auf 39,0°. Beim Hund I bildete sich später ein Absceß, der spontan wieder verschwand. Nachdem der Hund wieder vollkommen genesen war, wurde der in der Tabelle angeführte Kontrollversuch mit Na_2CO_3 in physiologischer Kochsalzlösung ohne β-Oxybuttersäure angestellt. Auch hier stellte sich am Tage nachher

eine leichte Temperatursteigerung bis 39,1° an. Am nächsten Tage betrug die Temperatur 39,8° und fiel dann wieder bis zur Norm ab. Alle diese Momente kommen nicht in Betracht, da mit Ausnahme des Versuches 23 die Untersuchung sich nur auf die ersten 24 Stunden erstreckt. Im Versuch 23 aber würde das Resultat ohne Temperatursteigerung wahrscheinlich noch deutlicher geworden sein.

Im Urin, der in den β-Oxybuttersäureversuchen entleert wurde, konnte nie eine deutliche Aceton- oder Eisenchloridreaktion nachgewiesen werden. Immerhin findet sich eine leichte Steigerung des Gesamtacetons (siehe Tabelle 2). Der Harn blieb optisch

Tabelle 2.

Versuch 21. — Hund I. — Körpergewicht 20 kg. — Am Anfang des Versuches hungert seit 24 Stunden. — Während des Versuches täglich 900 g Pferdefleisch.

	β-Oxybuttersäure injiziert	Aceton ausgeschieden (im Harn)	β-Oxybuttersäure als Aceton ausgeschieden (im Harn)
I. Tag	25,67	0,052	0,093
II. „	—	0,554	0,991
III. „	—	0,006	0,010
Totalmenge	25,67	0,612	1,094

Versuch 23. — Hund III. — Körpergewicht 12 kg. — Am Anfang des Versuches hungert seit 72 Stunden. — I. Versuchstag: 700 g Pferdefleisch. — II. Versuchstag: Hunger. — III. Versuchstag: reichlich Mehlspeise und Brot.

	β-Oxybuttersäure injiziert	Aceton ausgeschieden (im Harn)	β-Oxybuttersäure als Aceton ausgeschieden (im Harn)
I. Tag	25,25	0,082	0,146
II. „	—	0,026	0,046
III. „	—	0,011	0,019
Totalmenge	25,25	0,119	0,211

inaktiv. Daß keine größeren Mengen von racemischer β-Oxybuttersäure ausgeschieden wurden, geht daraus hervor, daß ich bei Destillation des Harns mit Schwefelsäure nur Spuren einer Säure erhielt, die wahrscheinlich α-Crotonsäure war, doch reichte die Menge zu einer Schmelzpunktbestimmung nicht aus.

Vergleichen wir Versuch 21 mit Versuch 19 und 20, so zeigt sich in den ersten 6 Stunden eine geringe, in den zweiten 6 Stunden eine hochgradige Zurückdrängung der Eiweißzersetzung, welche auch noch in den weiteren 12 Stunden, wenn auch nicht in so

Tabelle 3.
Hund I (Körpergewicht 20 kg).

Nr. des Versuches	Nr. des Hundes	Hungert seit Stunden	Nahrung	Subcutan injiziert	N-Ausscheidung in Prozent der Einfuhr					
					6	12	18	24		
					Stunden nach der Fütterung					
19	I	24	900 Pferdefleisch	—	27,8	61,0	—	90,0	—	—
20	I	24	900 „	—	26,6	61,1	—	90,1	—	—
21	I	24	900 „	β-Oxybuttersäure = 25,67 Na_2CO_3 = 10,54 NaCl = 0,97 Volum der Lösung 242 ccm	20,6	46,7	—	75,9	—	—
22	I	24	900 „	Na_2CO_3 = 10,68 NaCl = 0,98 Volum der Lösung 244 ccm	21,0	52,5	—	89,3	—	—

hohem Grade, weiterbesteht. Diese Zurückdrängung der Eiweißzersetzung ist aber nur zum Teil auf die β-Oxybuttersäure zurückzuführen, denn der Vergleich zwischen Versuch 19 und 20 und dem Kontrollversuch 22 mit Na_2CO_3 + NaCl zeigt, daß durch dieses allein die Eiweißzersetzung in den ersten 12 Stunden zurückgedrängt wird. Es stimmt dies mit der Angabe von Gruber[1]), daß NaCl die Kurve der Eiweißzersetzung abflacht. Vergleichen wir aber nur Versuch 22 mit 21, so ergibt ich, daß die Wirkung der β-Oxybuttersäure in der zweiten 6stündigen Periode einsetzt, um erst in den nachfolgenden 12 Stunden voll zur Geltung zu gelangen. Daß die β-Oxybuttersäure erst viel später wirkt als der Inosit, liegt an der subcutanen Applikation, resp. an der langsameren Resorption. Wir kommen also zu dem festen Schluß,

Tabelle 4.
Hund III (Körpergewicht 12 kg).

Nr. des Versuches	Nr. des Hundes	Hungert seit Stunden	Nahrung	Subcutan injiziert	N-Ausscheidung in Prozent der Einfuhr					
					8	16	24	32	40	48
					Stunden nach der Fütterung					
3	III	72	700 Pferdefleisch	—	19,6	50,1	71,6	81,2	88,4	94,8
23	III	72	700 „	β-Oxybuttersäure = 25,25 Na_2CO_3 = 10,32 NaCl = 0,95 Volum der Lösung 238 ccm	10,4	24,5	56,2	70,4	86,4	100,3

daß durch die β-Oxybuttersäure die Eiweißzersetzung zurückgedrängt wird.

Die beiden Versuche 3 und 23 sind nach 72stündigem Hunger angestellt. Obwohl hier kein Kontrollversuch mit Na_2CO_3 + NaCl allein vorliegt, so können wir doch mit Sicherheit schließen, daß die Wirkung der β-Oxybuttersäure auf die Eiweißzersetzung auch nach längerem Hunger voll zur Geltung kommt, denn in dem früher beschriebenen Kontrollversuch 22 sehen wir, daß die Wirkung von Na_2CO_3 + NaCl allein schon nach 24 Stunden abgelaufen ist. In meinem Versuch 23 steht aber die Eiweißzersetzung nach 24 Stunden noch um volle 15,5% gegenüber Versuch 3 zurück, nach 32 Stunden beträgt die Differenz noch ca. 11%, und erst nach 40 Stunden sind die Zahlen annähernd gleich. Wir kommen also zum Schluß, daß die β-Oxybuttersäure auch im hungernden glykogenarmen Organismus ihre Wirkung auf den Eiweißumsatz ausübt.

Wir können das Resultat der mitgeteilten Untersuchungen in folgenden Sätzen zusammenfassen:

I. Nach längerem Hunger wirken die Kohlenhydrate (Rohrzucker) nicht mehr verlangsamend auf die Eiweißzersetzung ein.

II. Dies gilt nur von den Kohlenhydraten; N-freie Energieträger (Fett, β-Oxybuttersäure), die nicht Glykogenbildner sind, verlieren ihre verlangsamende Wirkung auf den Eiweißumsatz nicht.

Über den Einfluß der Schilddrüse auf den zeitlichen Ablauf der Zersetzungen.

Von

G. A. Pari.

(Aus der I. Medizinischen Universitätsklinik in Wien.)

(Eingegangen am 18. August 1908.)

In ihrer Arbeit über die „Wechselwirkungen der Drüsen mit innerer Sekretion" haben Eppinger, Falta und Rudinger[1]) gezeigt, daß nach der Exstirpation der Schilddrüse der Hungereiweißumsatz bei Hunden stark herabgesetzt ist und daß er, im Gegensatz zum normalen Hungereiweißumsatz durch Kohlenhydrate oder Fett nicht weiter herabgedrückt werden kann. Werden aber schilddrüsenlose Hunde mit Schilddrüsenpräparaten behandelt, so steigt der Eiweißumsatz wieder an, und diese Steigerung kann durch Kohlenhydrate wieder prompt zum Verschwinden gebracht werden. Die Erscheinung läßt sich wohl in der Weise deuten, daß ein sehr bedeutender Kohlenhydratumsatz notwendig ist, um den an und für sich schon stark reduzierten Eiweißumsatz schilddrüsenloser Hunde noch weiter herabzudrücken. Verschiedene Momente, die in der Arbeit der genannten Autoren näher ausgeführt sind, weisen aber darauf hin, daß nach der Entfernung der Schilddrüse der Kohlenhydratumsatz herabgesetzt und die Kohlenhydratmobilisierung verlangsamt ist.

Nun haben wir in den voranstehenden Mitteilungen den Einfluß der Kohlenhydrate auf den zeitlichen Ablauf der Eiweißzersetzung unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Wenn nach Exstirpation der Schilddrüse tatsächlich eine Verlangsamung der Mobilisierung der Kohlenhydrate vorhanden ist, so war daher

[1]) Zeitschr. f. klin. Med. 66, 1908.

zu erwarten, daß sich dies auch unter den dort gewählten Versuchsbedingungen äußern werde.

Alle Versuchshunde waren annähernd gleich groß und gleich schwer (12 bis 14 kg Körpergewicht) und eher mager. Beim Hund IV (14 kg) wurde die Schilddrüse am 4. Februar 1908 exstirpiert. Beim Hund II (14 kg) am 13. April 1908. Es bestand keine Albuminurie. In den Rohrzuckerversuchen trat, sowohl bei den normalen als bei den schilddrüsenlosen Hunden, etwas Zucker im Harn auf. Bei den schilddrüsenlosen war die Menge kleiner (½ g) als bei den normalen (höchstens 2 g). Vor jedem Versuch erhielten die Hunde 4 Tage hindurch eine Standardkost, bestehend aus 700 g möglichst fettarmen Pferdefleisches, ca. 22,5 g N enthaltend. Die Nahrung wurde immer um 7 Uhr morgens gereicht und von den Hunden sofort verzehrt. Der Kot war immer spärlich und geformt.

Versuche an normalen Hunden.

Nr. des Versuches	Nr. des Hundes	Hungert seit Stunden	Nahrung	N-Ausscheidung in Prozent der Einfuhr					
				8	16	24	32	40	48
				Stunden nach der Fütterung					
1	III	24	700 Pferdefleisch	32,5	68,5	85,0	—	—	—
2	II	24	700 „	36,6	70,4	87,9	—	—	—
3	III	72	700 „	19,6	50,1	71,6	81,2	88,4	94,8
4	II	24	700 Pferdefleisch 180 Rohrzucker	9,5	44,3	67,8	84,3	99,0	102,5
5	III	72	„	17,1	52,3	83,4	89,5	—	97,3
			Versuche an schilddrüsenlosen Hunden.						
11	IV	24	700 Pferdefleisch	34,6	68,8	95,1	—	—	—
12	IV	24	700 „	34,9	68,0	94,5	—	—	—
13	II	24	700 „	36,3	68,3	83,3	—	—	—
14	II	24	700 Pferdefleisch 180 Rohrzucker	17,3	36,6	65,4	82,5	90,0	—
15	II	72	„	8,3	24,3	44,5	68,9	81,6	88,6

Der Vergleich von Versuch 1 und 2 mit 11, 12 und 13 zeigt, daß bei Fütterung mit Fleisch allein die Eiweißzersetzung bei normalen und schilddrüsenlosen Hunden denselben Ablauf zeigt. Versuch 4 und 14 zeigen nun, daß die Zulage einer großen Menge von Kohlenhydrat bei schilddrüsenlosen Hunden den Ablauf der Eiweißzersetzung anders beeinflußt als beim normalen.

Die verlangsamende Wirkung setzt bei dem schilddrüsenlosen Hunde viel langsamer ein, dauert aber dafür viel länger an, so daß erst von der vierten 8stündigen Periode an die Kurven gleich verlaufen.

Während nun aber bei normalen Hunden nach längerem Hunger die Wirkung der Kohlenhydrate auf den zeitlichen Ablauf der Eiweißzersetzung verschwindet, sehen wir beim schilddrüsenlosen Hund Nr. II (Versuch 15) jetzt eine außerordentlich deutliche Verlangsamung der Eiweißzersetzung durch die Kohlenhydratzulage eintreten. In einer zweiten Versuchsreihe an dem schilddrüsenlosen Hund IV habe ich dasselbe Resultat erzielt; ich habe die Zahlen aber nicht mit in der Tabelle aufgenommen, weil in beiden Versuchen (Fleisch + Rohrzucker nach 24 resp. 72stündigem Hungern) der Zucker am Versuchstag in 2 Portionen mit 15 Tropfen Opium gereicht wurde, so daß die Zahlenreihen mit den anderen nicht verglichen werden können.

Die Tatsache, daß die Wirkung der Kohlenhydrate auf den zeitlichen Ablauf der Eiweißzersetzung bei schilddrüsenlosen Hunden viel langsamer zur Geltung kommt entspricht also völlig unserer Voraussetzung. Aber auch die zweite Tatsache, daß im Gegensatz zum normalen die Wirkung der Kohlenhydraten nach längerem Hunger bei schilddrüsenlosen Hunden erhalten bleibt, dürfte sich der oben geäußerten Anschauung einreihen lassen. Wenn bei schilddrüsenlosen Hunden der Kohlenhydratumsatz, ebenso wie wir es von dem Eiweiß- und Fettumsatz wissen, herabgesetzt und die Kohlenhydratmobilisierung verlangsamt ist, so ist zu erwarten, daß bei schilddrüsenlosen Hunden im Hunger die Glykogendepots viel weniger rasch erschöpft werden, so daß nun mit dem Fleisch zugeführtes Kohlenhydrat noch seine Wirkung auf die Eiweißzersetzung ausüben kann. Vergleichen wir Versuch 14 mit Versuch 11, 12 und 13 und Versuch 15 mit Versuch 3,[1]) so ergibt sich, daß die Wirkung des Zuckers auf die Eiweißzersetzung nach 72stündigem Hunger un-

[1]) Wir besitzen noch keinen Versuch mit Fütterung von Fleisch allein nach 72stündigem Hunger bei einem schilddrüsenlosen Tier. Da aber im Ablauf der Eiweißzersetzung vor und nach der Schilddrüsenexstirpation nach 24stündigem Hunger kein Unterschied auftrat, so ist das gleiche auch für Versuche nach längerem Hunger mit größter Wahrscheinlichkeit zu erwarten.

gefähr ebenso stark ist wie beim normalgenährten Tier.

Der Ausfall der Untersuchungen läßt es wünschenswert erscheinen, zu untersuchen, ob sich bei schilddrüsenlosen Hunden nach längerem Hunger noch größere Mengen von Glykogen in den Organen nachweisen lassen.

Die Resultate lassen sich in folgenden Sätzen zusammenfassen:

Die Schilddrüse hat einen Einfluß auf den zeitlichen Ablauf der Zersetzungen, indem

a) bei schilddrüsenlosen Hunden die Wirkung der Kohlenhydrate auf den zeitlichen Ablauf der Eiweißzersetzung viel langsamer zur Geltung kommt und

b) bei schilddrüsenlosen Hunden nach längerem Hunger die Kohlenhydrate ihre verlangsamende Wirkung auf den Ablauf der Eiweißzersetzung nicht (so rasch) verlieren.

Hingegen wird Eiweiß allein vor und nach der Schilddrüsenexstirpation gleich rasch zersetzt.

Über den Wirkungsmechanismus von Arsenpräparaten auf Trypanosomen im tierischen Organismus.

II. Mitteilung.[1])

Von

Martin Jacoby und Albert Schütze.

(Aus dem Laboratorium des Krankenhauses Moabit in Berlin.)

(Eingegangen am 28. August 1908.)

In unserer ersten Arbeit[1]) haben wir über Versuche berichtet, welche beweisen, daß bei der Vernichtung der Trypanosomen im Tierkörper durch Arsenpräparate Leukocyten nicht beteiligt sind. Außerdem hatten wir beobachtet, daß Atoxyl, welches im Tierkörper in gleichem Maße wie arsenige Säure die Trypanosomen abtötet, im Reagensglas wenig auf die Trypanosomen einwirkt. In einer neuerdings erschienenen, sehr interessanten Mitteilung führt Levaditi[2]) diesen Umstand darauf zurück, daß das Atoxyl erst im Tierkörper durch Reduktion in ein „Trypanatoxyl", d. h. in eine Trypanosomen abtötende Verbindung übergeführt werden muß.

Wir hatten nun die Absicht, auf Grund unserer Befunde den Verlauf der von Ehrlich entdeckten Atoxylfestigkeit der Trypanosomen im Reagensglase zu prüfen. Zu diesem Zwecke haben wir vor mehreren Monaten damit begonnen, uns arsen-, resp. atoxylfeste Stämme zu züchten. Über die Versuche mit solchen Stämmen werden wir später berichten. Vorläufig haben wir hinreichende Erfahrungen darüber, wie sich im Reagensglase vergleichsweise gegen die Gifte normale Trypanosomenstämme und solche verhalten, die etwa 2 Monate in ständiger Berührung mit Arsen und Atoxyl kultiviert sind.

---

[1]) Diese Zeitschr. 12, 193, 1908.

[2]) Soc. de biolog., 10. VII. 1908.

Alle Versuche wurden mit Naganatrypanosomen angestellt. Als Normaltrypanosomen oder N. bezeichnen wir im folgenden solche Trypanosomen, welche ohne weitere Eingriffe von Maus zu Maus fortgezüchtet worden sind. Die Mäuse sterben, je nach der Dosis, etwas früher oder später, zumeist aber spätestens am vierten Tage. Die Impfung erfolgte stets subcutan. Atoxyltrypanosomen oder At. nennen wir Trypanosomen, die wochenlang dauernd mit Atoxyl in Berührung waren. Mäusen wurde 0,1 bis 0,2 ccm = 1 bis 2 mgr Atoxyl und dann nach 2 bis 3 Stunden Trypanosomen subcutan injiziert. Benutzt wurde krystallisiertes Atoxyl der Vereinigten Chemischen Werke Charlottenburg, das in physiologischer Kochsalzlösung gelöst wurde. Die Lösungen wurden im Dunkeln und nie längere Zeit aufgehoben. Die Dosis war so gewählt, daß die Trypanosomen sicher noch mit einer hinreichenden Atoxylmenge im Tierkörper in Berührung kamen. Von den ersten Mäusen, welche so mit Atoxyl und mit Trypanosomen behandelt waren, wurden dann nach einigen Tagen die Trypanosomen auf Mäuse übertragen, die in gleicher Weise mit Atoxyl vorbehandelt waren. Wir bezeichnen die erste Serie mit At_1, die folgenden mit entsprechendem Index, z. B. die 20. Übertragung mit At_{20}.

Entsprechende Reihen wurden mit arseniger Säure angelegt. Die arsenige Säure war, wie in der vorigen Arbeit, nach den Vorschriften von Löffler und Rühs in Lösung gebracht worden, indem sie in Normalnatronlauge gelöst und die Lauge dann genau mit Normalsalzsäure neutralisiert wurde. Die Verdünnungen wurden mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Die Stammlösung (1 %) hält sich gut, wenn man sie in der Kälte und im Dunkeln aufbewahrt. Für die Mäuseimpfung benutzten wir 1 ‰ ige Lösungen, von denen die Tiere 0,05 und 0,1 ccm, also 0,05 und 0,1 mg erhielten. Diese Dosen wurden immer vertragen, aber sie dürfen sicher nicht wesentlich überschritten werden. Im übrigen gingen wir ganz wie bei den Atoxylmäusen vor. Die einzelnen Reihen werden im folgenden als As_1 usw. erwähnt, also z. B. die 20. Übertragung auf Mäuse, die mit arseniger Säure vorbehandelt waren, als As_{20}.

Die Reagensglasversuche selbst wurden genau so angestellt, wie in der ersten Mitteilung beschrieben worden ist. Von den Lösungen der arsenigen Säure resp. des Atoxyls wurden immer

0,3 ccm angewandt, in die wir mit einer Capillare gleiche Mengen Blut brachten, welches aus dem Herzen gewonnen war. Die mikroskopische Untersuchung erfolgte an Präparaten im hängenden Tropfen. Bis zur Untersuchung verblieben die Gemische bei Zimmertemperatur, die Versuche wurden im Juli und August angestellt. Wir geben nun die Resultate im einzelnen wieder.

Versuch I.

Blut von Arsenmaus aus Serie 15 = As_{15}.
Blut von Normaltrypanosomenmaus = N.
In Lösungen von arseniger Säure

1 ccm = 1 mg (As $^1/_1$)
und 1 ccm = 0,1 mg (As $^1/_{10}$)

sind sowohl As_{15} wie N sofort tot.

In As $^1/_{100}$ sind N auch sofort tot, während As_{15} nach 50 Minuten, 80 und 100 Minuten noch beweglich, wenn auch nur schwach beweglich sind.

Nach 150 Minuten sind auch As_{15} tot.

Versuch II.

Blut von As_{17} und N.

Acidum arsenicosum-Lösungen:

1 ccm = $^1/_{50}$ mg As $^1/_{50}$.
1 ccm = $^1/_{100}$ mg As $^1/_{100}$.
1 ccm = $^1/_{200}$ mg As $^1/_{200}$.

Nach 40 bis 50 Minuten sind N noch sämtlich lebend, wenn auch in As $^1/_{50}$ und $^1/_{100}$ bereits im Sterben, As_{17} in allen Lösungen bereits tot.

Nach 80 Minuten sind N_{50} (d. h. N in As $^1/_{50}$) alle tot.
N_{100} meistens tot, die übrigen im Sterben.
N_{200} in sehr schwacher Bewegung.
As_{50}, As_{100} und As_{200} alles tot.

(As_{50} bedeutet also: As_{17} in As $^1/_{50}$.)

Nach 150 Minuten N_{200} noch deutlich beweglich.

Versuch III.

Blut von As_{18} und N.

Acidum arsenicosum:

As $^1/_{50}$.
As $^1/_{100}$.
As $^1/_{200}$.

Nach 10 bis 30 Minuten lebt noch alles.

Nach 45 bis 50 Minuten lebt alles mit Ausnahme von As_{50}, die sämtlich tot sind.

Nach 65 bis 80 Minuten ist die Beweglichkeit von N_{50} etwas verlangsamt, N_{100} fast normal, N_{200} normal, während As_{50} alles tot ist, As_{100} im Sterben, As_{200} verlangsamte Beweglichkeit zeigt.

Nach 100 bis 120 Minuten ist:

N_{50} im Sterben.	As_{50} alles tot.
N_{100} schlechte Beweglichkeit.	As_{100} fast tot.
N_{200} ganz gute Beweglichkeit.	As_{200} mittlere Beweglichkeit.

Nach 140 Minuten:

N_{50} fast tot.	As_{50} tot.
N_{100} tot.	As_{100} tot.
N_{200} noch beweglich.	As_{200} fast tot.

Versuch IV.

Blut von As_{18}, At_{18} und Normaltrypanosomen.

Acidum arsenicosum-Lösung:	Atoxyllösungen:
As $^1/_{50}$.	2 %ige = At 2 %.
As $^1/_{100}$.	1 %ige = At 1 %.
As $^1/_{200}$.	

Wir bezeichnen Blut As_{18} in As $^1/_{50}$ als As_{50}.
„ „ „ As_{18} „ At 1 % „ As 1 %.
„ „ „ At_{18} „ At 2 % „ At 2 % usw.

Nach 5 Minuten ist:	Nach 10 Minuten ist:
N_{50}, As_{50}, At_{50} sehr stark beweglich.	N 2 %, As 2 %, At 2 % sehr stark beweglich.

Nach 20 Minuten ist:	Nach 20 Minuten ist:
N_{50} sehr starke Beweglichkeit.	N 2 % sehr starke Beweglichkeit.
As_{50} etwas verlangsamte Beweglichkeit.	As 2 % deutliche Beweglichkeit.
At_{50} starke Beweglichkeit.	At 2 % sehr starke Beweglichkeit.

Nach 30 Minuten ist:

N_{100} verlangsamte, aber deutliche Beweglichkeit.

As_{100} etwas schwächer beweglich als N_{100}.

At_{100} starke Beweglichkeit.

Nach 35 Minuten ist:

N_{100} deutliche, verlangsamte Beweglichkeit.

As_{100} schwach beweglich, teilweise tot.

At_{100} sehr schnelle Beweglichkeit.

Nach 40 Minuten ist:

N_{50} zumeist tot, einige sterbend.

As_{50} ,, ,, ,, ,,

At_{50} deutliche Beweglichkeit.

Nach 45 Minuten ist:

N 2 % deutliche, etwas verlangsamte Beweglichkeit.

As 2 % langsame, aber gut erkennbare Beweglichkeit.

At 2 % sehr starke Beweglichkeit.

Nach 50 Minuten ist:

N_{200} stark verlangsamte Beweglichkeit.

As_{200} etwas stärker beweglich als N_{200}.

At_{200} sehr starke Beweglichkeit.

Nach 60 Minuten ist:

N 1 % deutliche, aber verlangsamte Beweglichkeit.

As 1 % deutliche, aber verlangsamte Beweglichkeit.

At 1 % in geringer Zahl vorhanden und tot.

Nach 70 Minuten ist:

N_{50} alles tot.

As_{50} ,, ,,

At_{50} stark verlangsamte, aber deutliche Beweglichkeit.

Nach 70 Minuten ist:

N 2 % deutliche, aber verlangsamte Beweglichkeit.

As 2 % deutliche, aber verlangsamte Beweglichkeit.

At 2 % sehr starke Beweglichkeit.

Nach 70 Minuten ist:

N_{100} sterbend.

As_{100} meist tot, vereinzelte sterbend.

At_{100} starke, ein wenig verlangsamte Beweglichkeit.

Nach 85 Minuten ist:

N_{200} stark verlangsamte, aber noch erkennbare Beweglichkeit.

As_{200} deutliche Beweglichkeit, einige schlechter beweglich.

At_{200} sehr deutliche Beweglichkeit.

Nach 85 Minuten ist:

N 1 % schwache, aber deutliche Beweglichkeit.

As 1 % deutliche, aber etwas verlangsamte Beweglichkeit.

Nach 100 Minuten ist:

At_{50} tot oder im Sterben.

Nach 100 Minuten ist:

N 2 % deutliche, aber stark verlangsamte Beweglichkeit.

As 2 % Beweglichkeit sehr verlangsamt, teilweise sterbend.

At 2 % sehr schnelle Beweglichkeit.

Nach 110 Minuten ist:

N_{100} meist tot.

As_{100} ,, ,,

At_{100} ,, ,,

Nach 115 Minuten ist:

N_{200} fast alles tot.
As_{200} sehr langsame Beweglichkeit, einzelne tot.
At_{200} meist tot.

Nach 120 Minuten ist:

N 1% im Sterben.
As 1% fast alles tot.

Nach 125 Minuten ist:

N 2% sehr stark verlangsamte Beweglichkeit, keine toten.
As 2% sterbend.
At 2% lebhafte Beweglichkeit.

Nach 180 Minuten ist:

N 2% fast alles tot.
As 2% alles tot.
At 2% zumeist in lebhafter Beweglichkeit, einige etwas weniger beweglich.

Versuch V.

Blut von As_{19}, At_{18} und Normaltrypanosomen. — N von einem Tiere kurz vor dem Tode mit besonders zahlreichen Trypanosomen.

Lösungen:

As 1/50.
As 1/100.
As 1/200.
At 2%.
At 1%.

Nach 10 Minuten ist:

N_{50} schwache Beweglichkeit, alles lebend.
As_{50} deutliche, etwas verlangsamte Beweglichkeit.
At_{50} die meisten sterbend oder schon tot.

Nach 20 Minuten ist:

N_{100} stark verlangsamte Beweglichkeit.
As_{100} besser als N_{100} beweglich.
At_{100} etwa wie N_{100}.

Nach 30 Minuten ist:

N 2% teilweise tot, die übrigen sehr verlangsamte Beweglichkeit.
As 2% starke Beweglichkeit
At 2% „ „

Nach 40 Minuten ist:

N_{200} fast alles tot.
As_{200} deutliche, wenn auch etwas verlangsamte Beweglichkeit.
At_{200} etwas besser beweglich als As_{200}.

Nach 50 Minuten ist:

N 1% ziemlich gute Beweglichkeit, teilweise langsam.
As 1% gute Beweglichkeit, besser als N 1%.
At 1% schlechte Beweglichkeit.

Nach 55 Minuten ist:

N_{50} alles tot.
As_{50} fast alles tot.
At_{50} alles tot.

Nach 60 Minuten ist:

N_{100} alles tot.
As_{100} schwache Beweglichkeit.
At_{100} im Sterben.

Nach 65 Minuten ist:

N 2% alles tot,
As 2% deutliche Beweglichkeit, keine toten.
At 2% Beweglichkeit schlechter als As 2%.

Nach 65 Minuten ist:

N_{200} zumeist tot, vereinzelte sterbend.

As_{200} keine toten, überall noch sehr geringe Beweglichkeit.

At_{200} zumeist sterbend, keine toten.

Nach 70 Minuten ist:

N 1% alles sterbend.

As 1% keine sterbenden oder toten, aber sehr geringe Beweglichkeit.

At 1% alles tot.

Nach 95 Minuten ist:

N_{100}, As_{100}, At_{100} alles tot.

Nach 100 Minuten ist:

N 2% alles tot.

As 2% im Sterben.

At 2% alles tot.

Nach 105 Minuten ist:

N_{200} alles tot.

As_{200} „ sterbend.

At_{200} „ „

Nach 110 Minuten ist:

N 1% alles tot.

As 1% „ „

At 1% „ „

Versuch VI.

Blut von As_{20} und N.

Lösungen:

As $^1/_{50}$.

As $^1/_{100}$.

As $^1/_{200}$.

Nach 5 Minuten ist:

N_{50} nicht sehr stark beweglich. As_{50} stärker beweglich als N_{50}.

Nach 15 Minuten ist:

N_{100} gute Beweglichkeit. As_{100} sehr gute Beweglichkeit.

Nach 20 Minuten ist:

N_{200} und As_{200} sehr gute Beweglichkeit.

Nach 25 Minuten ist:

N_{50} lebend, aber nur schwach beweglich.

N_{100} besser als N_{50} beweglich.

As_{50} starke Beweglichkeit.

As_{100} wenig schwächer beweglich als N_{100}.

Nach 30 Minuten ist:

N_{200} sehr stark beweglich. As_{200} stärker beweglich als N_{200}.

Nach 45 Minuten ist:

N_{50} meist tot, die übrigen sterbend.

N_{100} schwach beweglich, nichts im Sterben.

N_{200} fast sterbend.

As_{50} mäßig beweglich, nichts sterbend.

As_{100} stark beweglich.

As_{200} „ „

Nach 55 Minuten ist:

N_{50} meist tot, die übrigen sterbend.

As_{50} wenig Trypanosomen noch sichtbar, deutlich beweglich, vereinzelte tot und sterbend.

Nach 60 Minuten ist:

N_{100} im Sterben.

N_{200} fast im Sterben.

As_{100} stark beweglich.

As_{200} teilweise schwache,
„ starke Beweglichkeit, mehrere im Sterben.

Nach 80 Minuten ist:

N_{50} meist tot, einige im Sterben.

As_{50} wie N_{50}.

Nach 85 Minuten ist:

N_{100} tot oder im Sterben.

As_{100} mäßige, vereinzelt starke Beweglichkeit.

N_{200} zumeist im Sterben, einige tot.

As_{200} zumeist ziemlich starke Beweglichkeit.

Versuch VII.

Blut von As_{20} und At_{19} und von N.

Das Blut von N enthält ziemlich wenig Trypanosomen.

As $^1/_{50}$.
„ $^1/_{100}$.
„ $^1/_{200}$.

At 2 %.
At 1 %.

Nach 15 Minuten ist:

N_{50} mittlere Beweglichkeit.

As_{50} besser als N_{50}.

At_{50} alles tot.

Nach 35 Minuten ist:

N_{200} sehr starke Beweglichkeit.

As_{200} alles tot.

At_{200} ziemlich lebhafte Beweglichkeit.

Nach 50 Minuten ist:

N_{100} sehr starke Beweglichkeit.

As_{100} alles tot.

At_{100} „ „

Nach 60 Minuten ist:

As 2 % sehr deutliche Beweglichkeit.

At 2 % alles tot.

Nach 25 Minuten ist:

N 2 % alles tot.

As 2 % sehr schnelle Beweglichkeit.

At 2 % alles tot.

Nach 45 Minuten ist:

N 1 % sehr starke Beweglichkeit.

As 1 % deutliche, aber langsame Beweglichkeit.

At 1 % sterbend oder tot.

Nach 60 Minuten ist:

N_{50} deutliche Beweglichkeit.

As_{50} alles tot.

At_{50} „ „

Nach 65 Minuten ist:

N_{200} besonders starke Beweglichkeit.

As_{200} alles tot.

At_{200} tot oder im Sterben; einige in mäßiger Bewegung.

Nach 70 Minuten ist:

N 1 % verlangsamte Beweglichkeit.
As 1 % sehr deutliche „
At 1 % alles tot.

Nach 90 Minuten ist:

N_{50} mittlere Beweglichkeit.
As 2 % sehr schlechte Beweglichkeit, teils sterbend oder tot.
N_{200} sehr gute Beweglichkeit.

Nach 110 Minuten ist:

N_{50} alles tot.
As 2 % sterbend oder tot.

Nach 155 Minuten ist:

N_{50} alles tot.
N_{200} meist sterbend, einige besser beweglich.
As 2 % fast tot.
As 1 % meist sterbend.

Nach 70 Minuten ist:

N_{100} sehr starke Beweglichkeit.
As_{100} tot oder im Sterben.
At_{100} alles tot.

Nach 95 Minuten ist:

N 1 % sehr gute Beweglichkeit.
As 1 % mittlere, aber noch ganz gute Beweglichkeit.
N_{100} tot oder im Sterben.

Nach 125 Minuten ist:

N_{200} schwach beweglich.
N 1 % „ „
As 1 % „ „
N_{100} alles tot.

Nach 165 Minuten ist:

N_{200} fast alles tot.

Versuch VIII.

Blut von As_{21} und von N.

As $^1/_{50}$.
As $^1/_{100}$.
As $^1/_{200}$.

At 2 %.
At 1 %.

Nach 15 Minuten ist:

N_{50}, As_{50} } schwache Beweglichkeit.

Nach 25 Minuten ist:

N_{100} starke Beweglichkeit.
As_{100} tot oder im Sterben.

Nach 40 Minuten ist:

N 2 % stark beweglich.
As 2 % weniger gut beweglich.

Nach 50 Minuten ist:

$_{00}$ mittlere Beweglichkeit, einige weniger gut beweglich, keine toten.

Nach 20 Minuten ist:

N 1 % starke Beweglichkeit.
As 1 % sehr starke Beweglichkeit.

Nach 35 Minuten ist:

N_{200} schwache Beweglichkeit.
As_{200} tot oder im Sterben.

Nach 45 Minuten ist:

N_{50} tot oder im Sterben.
As_{50} tot.
N 1 % mittlere Beweglichkeit.
As 1 % langsame „

Nach 55 Minuten ist:

As_{100} tot oder sterbend.
N_{200} schwache Beweglichkeit.
As_{200} tot oder sterbend.

Nach 60 Minuten ist:
N 2 % äußerst starke Beweglichkeit.
As 2 % zumeist sterbend.

Nach 70 Minuten ist:
N 1 % sehr gute Beweglichkeit.
As 1 % tot oder sterbend.

Nach 75 Minuten ist:
N_{100} schwach beweglich, zum Teil sterbend.
N_{200} sehr schwach beweglich.

Nach 80 Minuten ist:
N 2 % deutliche Beweglichkeit.
As 2 % meist tot.

Nach 105 Minuten ist:
N 1 % schwach beweglich.

Nach 110 Minuten ist:
N_{100} tot oder sterbend.
N_{200} sterbend.
N 2 % tot oder sterbend.

Nach 120 Minuten ist:
N 1 % sterbend.

Versuch IX.

Blut von As_{22}, At_{21} und von N.

As $^1/_{50}$.
As $^1/_{100}$.
As $^1/_{200}$.

At 2 %.
At 1 %.

Bei dem Versuch ist vielleicht ein Fehler dadurch entstanden, daß die Kochsalzlösung zur Herstellung der Arsen-Verdünnungen noch etwas warm war.

Nach 10 Minuten ist:
N_{50} alles tot.
As_{50} alles tot oder sterbend, einzelne besser beweglich.
At_{50} die meisten sterbend.

Nach 25 Minuten ist:
N_{100} schwache Beweglichkeit, vereinzelt sterbend oder tot.
As_{100} deutliche Beweglichkeit.
At_{100} fast alles tot.

Nach 30 Minuten ist:
N 1 % deutliche Beweglichkeit.
As 1 % sehr rasche Beweglichkeit.
At 1 % verlangsamte Beweglichkeit.

Nach 35 Minuten ist:
N_{200} schwache Beweglichkeit oder sterbend.
As_{200} schwache Beweglichkeit, einzelne tot oder sterbend.
At_{200} tot oder sterbend.

Nach 45 Minuten ist:
N 2 % starke Beweglichkeit.
As 2 % mittlere Beweglichkeit.
At 2 % langsame Beweglichkeit.

Nach 50 Minuten ist:
N_{100} tot oder sterbend.
As_{100} schwache Beweglichkeit.

Nach 55 Minuten ist:
N 1 % deutliche Beweglichkeit.

Nach 60 Minuten ist:
N_{200} sterbend.

As 1 % sehr starke Beweglichkeit.
At 1 % langsame Beweglichkeit.

As_{200} schwach beweglich, zum Teil sterbend.
At_{200} tot oder sterbend.
N 2 % starke Beweglichkeit.
As 2 % mittlere „
At 2 % tot oder sterbend, einige besser beweglich.

Nach 80 Minuten ist:

As_{100} schwache Beweglichkeit.
N 1 % mittlere „
As 1 % sehr starke „
At 1 % tot, einzelne sterbend.

Nach 90 Minuten ist:

N_{200} sehr schwache Beweglichkeit.
As_{200} tot oder sterbend.
N 2 % starke Beweglichkeit.
As 2 % mittlere „
At 2 % tot oder sterbend.

Nach 105 Minuten ist:

As_{100} sehr schlechte Beweglichkeit.
N 1 % zum Teil tot, zum Teil mittlere Beweglichkeit.

Nach 110 Minuten ist:

As 1 % sehr starke Beweglichkeit.

Nach 115 Minuten ist:

N_{200} tot oder sterbend.
N 2 % schwache, teilweise starke Beweglichkeit.
As 2 % schwache Beweglichkeit.

Nach 140 Minuten ist:

As_{100} schwache Beweglichkeit, fast sterbend.
N 1 % mittlere Beweglichkeit, teilweise tot

Nach 145 Minuten ist:

As 1 % starke Beweglichkeit.
N 2 % schwache „
As 2 % sterbend.

Versuch X.

Blut von As_{22}, At_{22} und von N.
Lösungen wie immer.

Nach 15 Minuten ist:

N_{50} mittlere Beweglichkeit.
As_{50} stärkere „
At_{50} mittlere „

N_{100} schwache Beweglichkeit, zum Teil sterbend.
As_{100} sehr starke Beweglichkeit.
At_{100} schwache Beweglichkeit, zum Teil sterbend.

Nach 25 Minuten ist:

N 1 % starke Beweglichkeit.
As 1 % enorm starke Beweglichkeit.
At 1 % „ „ „

Nach 35 Minuten ist:

N_{200} schwache Beweglichkeit, zum Teil sterbend.
As_{200} starke Beweglichkeit.
At_{200} mittlere Beweglichkeit.

Nach 45 Minuten ist:
N 2 % enorm starke Beweglichkeit.
As 2 % „ „ „
At 2 % starke Beweglichkeit.

Nach 65 Minuten ist:
N_{50} tot oder sterbend.
As_{50} schwache Beweglichkeit.
At_{50} tot oder sterbend.
N_{100} schwache Beweglichkeit.
As_{100} starke „
At_{100} sehr schwache Beweglichkeit.

Nach 75 Minuten ist:
N 1 % starke Beweglichkeit.
As 1 % sehr starke Beweglichkeit.
At 1 % „ „ „
N_{200} tot oder sterbend.
As_{200} starke Beweglichkeit.

Nach 80 Minuten ist:
At_{200} tot oder sterbend.
N 2 % starke Beweglichkeit.

Nach 90 Minuten ist:
At 2 % sehr starke Beweglichkeit.
As 2 % „ „ „

Nach 105 Minuten ist:
As_{50} sehr schwach beweglich, zu meist sterbend oder tot.
N_{100} sterbend oder tot.

Nach 110 Minuten ist:
As_{100} starke Beweglichkeit.
At_{100} tot oder sterbend.
N 1 % starke Beweglichkeit.

Nach 115 Minuten ist:
As 1 % starke Beweglichkeit.
At 1 % sehr starke Beweglichkeit.

Nach 120 Minuten ist:
As_{200} mittlere Beweglichkeit.
N 2 % starke „
As 2 % „ „
At 2 % sehr starke Beweglichkeit.

Nach 135 Minuten ist:
As_{100} tot.
N 1 % mittlere Beweglichkeit.
As 1 % sehr starke Beweglichkeit.
At 1 % „ „ „

Nach 140 Minuten ist:
As_{200} mittlere Beweglichkeit.
N 2 % „ „
As 2 % starke „
At 2 % „ „

Versuch XI.

Blut von As_{23} und von N.
Lösungen wie immer.

Nach 20 Minuten ist:
N_{50}, As_{50} tot oder sterbend.

Nach 25 Minuten ist:
N_{100} tot.
As_{100} tot oder schwache Beweglichkeit.
N_{200} tot oder sterbend.
As_{200} tot oder sterbend, zum Teil schwach beweglich.

Betrachten wir diese Versuche zusammenfassend, so scheint es uns zunächst nötig, nur Resultate ein und desselben Versuchs zu vergleichen, da nur dann die Sicherheit übereinstimmender Bedingungen gegeben ist. Die Fehlerquellen der mikroskopischen Beobachtung sind bei genügender Übung und Zahl der Einzelbeobachtungen nicht störend, wohl aber darf man nicht vergessen, daß sicherlich auch die Trypanosomen derselben Maus je nach dem Stadium der Infektion in ihrer Empfindlichkeit schwanken werden und daß es daher kaum möglich sein wird, zwei Mäuse in genau dem gleichen Stadium der Infektion zu untersuchen. Hierin wird immer eine Schwäche der Reagensglasversuche bestehen. Allerdings haben wir diesen Mangel dadurch möglichst abzuschwächen versucht, daß wir den Mäusen das Blut erst bei vorgeschrittenster Infektion entnahmen. Auf diese Weise war es auch am ehesten möglich, Unregelmäßigkeiten zu vermeiden, die etwa durch den verschieden großen Reichtum des Blutes an Trypanosomen hätte entstehen können.

Die Durchsicht der Reihen ergibt nun:

In 4 Versuchen waren Arsentrypanosomen weniger empfindlich als Normaltrypanosomen gegen arsenige Säure.

In 4 Versuchen waren Arsentrypanosomen empfindlicher als Normaltrypanosomen gegen arsenige Säure.

In 3 Versuchen war die Empfindlichkeit der Arsentrypanosomen und der Normaltrypanosomen gegen arsenige Säure gleich.

In 2 Versuchen waren Atoxyltrypanosomen weniger empfindlich als Normaltrypanosomen gegen arsenige Säure.

In 2 Versuchen waren Atoxyltrypanosomen empfindlicher als Normaltrypanosomen gegen arsenige Säure.

In 1 Versuche war die Empfindlichkeit der Atoxyltrypanosomen und der Normaltrypanosomen gegen arsenige Säure gleich.

In 3 Versuchen war die Empfindlichkeit der Arsentrypanosomen gleich der Empfindlichkeit der Atoxyltrypanosomen gegen arsenige Säure.

In 1 Versuche waren die Arsentrypanosomen weniger empfindlich als Normaltrypanosomen gegen Atoxyl.

In 1 Versuche waren die Arsentrypanosomen empfindlicher als die Normaltrypanosomen gegen Atoxyl.

In 3 Versuchen war die Empfindlichkeit der Arsentrypanosomen gleich der Empfindlichkeit der Normaltrypanosomen gegen Atoxyl.

In 1 Versuche waren die Atoxyltrypanosomen weniger empfindlich als die Normaltrypanosomen gegen Atoxyl.

In 2 Versuchen waren die Atoxyltrypanosomen empfindlicher als die Normaltrypanosomen gegen Atoxyl.

In 1 Versuche war die Empfindlichkeit der Atoxyltrypanosomen gleich der Empfindlichkeit der Normaltrypanosomen gegen Atoxyl.

In 2 Versuchen waren die Arsentrypanosomen weniger empfindlich als die Atoxyltrypanosomen gegen Atoxyl.

In 1 Versuche waren die Arsentrypanosomen empfindlicher als die Atoxyltrypanosomen gegen Atoxyl.

Die mit arseniger Säure resp. mit Atoxyl behandelten, noch nicht arsenfesten Stämme haben also keine Unterschiede in ihrem Verhalten zu den Arsenpräparaten gegenüber normalen Trypanosomen im Reagensglas gezeigt, jedenfalls sind sie nicht im Reagensglas arsenfest. Möglicherweise wechselt bei der Behandlung die Empfindlichkeit in dem Sinne, daß wie bei der Immunisierung von höheren Tieren Stadien der Überempfindlichkeit der Immunität vorausgehen. Die Versuche sollen uns als Kontrollversuche für die Beobachtungen an arsenfesten Stämmen dienen, die wir anstellen werden, sobald unsere Stämme hinreichend hierzu vorbereitet sind.

Biochemische Umwandlung der Glutaminsäure in n-Buttersäure.

Von

W. Brasch und C. Neuberg.

(Aus der Chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

Durch Fäulnisbakterien werden die Proteine in ähnlicher Weise wie durch hydrolysierende Enzyme gespalten, d. h. es kommt wenigstens intermediär zu einer Bildung von Aminosäuren. An diesen können die Fäulnisbakterien dann eine doppelte Veränderung verrichten, deren erste in einer Desamidierung, deren zweite in einer Kohlensäureabspaltung besteht. Dabei findet die Dekarboxylierung vorzugsweise bei den stark basischen Produkten, den Diaminosäuren, statt, die Loslösung der Aminogruppe bei den Monoaminosäuren. So ist die Bildung von Aminen und Diaminen einerseits, von aliphatischen und gemischt-fettaromatischen Säuren andrerseits zu deuten.

Neuberg und Rosenberg[1]), welche die bei der Fäulnis, speziell des Caseins auftretenden freien Fettsäuren einer fraktionierten Trennung unterworfen haben, fanden, daß mehr als ein Drittel der gesamten, aus 1 kg Casein erhaltenen flüchtigen Fettsäuren aus der normalen Buttersäure bestand.

Es ist nun ganz ausgeschlossen, daß diese Bildung von n-Buttersäure auf eine durch Fäulnis bewirkte Desamidierung von Amino-n-buttersäure zurückzuführen ist. Denn die letztere findet sich in der Natur äußerst selten und spärlich, und die alte Angabe von Schützenberger, der sie aus verschiedenen Eiweißkörpern durch Erhitzen mit Barythydrat erhalten haben wollte, konnte durch spätere Untersuchungen nicht bestätigt

[1]) Diese Zeitschr. 7, 178, 1907.

werden. E. Fischer und A. Skita[1]) halten es für wenig wahrscheinlich, daß sie Schützenberger überhaupt je in Händen gehabt hat. Wenn im vorliegenden Falle die Buttersäure aus einer im Casein präformierten Aminobuttersäure entstanden wäre, so müßte die letztere etwa den dritten Teil der Monaminosäuren des Caseinmoleküls ausgemacht haben. Eine derartige Annahme verbietet sich nach den vielen genauen Untersuchungen, welchen das Casein namentlich E. Fischer und E. Abderhalden unterzogen haben, von selbst. Es mußte also eine andere Muttersubstanz für die durch die Fäulnis entstandene Buttersäure vorhanden sein, und hier kommt, wie schon früher Neuberg und Rosenberg ausgeführt haben, vor allem eben die Glutaminsäure in Betracht.

Wir haben nun die bereits angekündigten Fäulnisversuche mit reiner Glutaminsäure ausgeführt und tatsächlich ihren Übergang in n-Buttersäure festgestellt.

Bezüglich der chemischen Seite dieser Umwandlung sei auf die früheren Ausführungen von Neuberg[2]) verwiesen.

Es tritt also bei der Glutaminsäurefäulnis Ersatz der Aminogruppe und Loslösung von Kohlensäure am selben C-Atom ein:

$$COOH - CH_2 - CH_2 - CHNH_2 - COOH \longrightarrow$$
$$COOH - CH_2 - CH_2 - CH_3$$

Ob die beiden Prozesse, Desamidierung und Kohlensäureabspaltung, gleichzeitig erfolgen, oder ob die erstere letzterer vorangeht, ist unentschieden. Gegen eine Bildung von Glutarsäure in größerem Umfange spricht nach Neuberg und Rosenberg die Erfahrung, daß Glutarsäure höchstens in Spuren bei der Fäulnis selbst sehr glutaminsäurereicher Proteinstoffe auftritt. Auch im vorliegendem Falle haben wir vergebens auf Glutarsäure unter den nichtflüchtigen Produkten der gefaulten Glutaminsäure gefahndet.

Die angewandte Glutaminsäure war auf die gewöhnliche Art aus Casein dargestellt, bestand also aus der d-Säure. Die

---

[1]) E. Fischer und A. Skita, Zeitschr. f. physiol. Chem. 33, 188, 1901.

[2]) C. Neuberg, Sitzungsber. d. Kgl. Preuß. Akad. der Wissenschaften, Tagung vom 16. Mai 1907; siehe auch C. Neuberg und E. Rosenberg, l. c.

Fäulnis selbst wurde in derselben Weise, wie es bei Eiweißkörpern üblich ist, angesetzt. Zur Orientierung diente folgender Versuch:

5 g Glutaminsäure wurden in 250 ccm Wasser gelöst, mit Soda gerade alkalisch gemacht und mit einigen Tropfen Fäulnislösung[1]) versetzt. Schon nach wenigen Tagen ließ sich das Auftreten von flüchtiger Fettsäure daran konstatieren, daß eine Probe beim Erwärmen mit verdünnter Schwefelsäure saure und intensiv nach Buttersäure riechende Dämpfe entwickelte. Nach ungefähr 20tägigem Verweilen im Brutschranke wurde mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und am absteigenden Kühler abdestilliert. Das Übergegangene, das stark nach Fettsäuren roch, wurde dann mit Soda schwach alkalisch gemacht, in verdünnter Lösung zur Fällung von Chloriden mit Silbernitrat versetzt und aufgekocht, filtriert, das chlorfreie Filtrat eingeengt, abermals filtriert und mit konzentrierter Silbernitratlösung ausgefällt. Es schied sich ein reichlicher weißer Niederschlag ab, der abfiltriert und mit Wasser, Alkohol und Äther ausgewaschen wurde. Am anderen Morgen war die Fällung, die über Nacht im Exsiccator gestanden hatte, stark geschwärzt, was auf einen Gehalt an Ameisensäure zurückzuführen war. Sie wurde deshalb fein zerrieben und in ca. 100 ccm Wasser suspendiert, eine halbe Stunde in einem Kolben gekocht und dann mit Schwefelsäure zerlegt. Nach dem Erkalten wurde filtriert und die freie Säure mit Äther extrahiert, der Ätherauszug verdunstet, der Rückstand mit verdünntem Ammoniak aufgenommen, dessen Überschuß verdampft und dann mit konzentriertem Silbernitrat ausgefällt. Da durch Selbstreduktion des ursprünglichen Silbersalzes die Ameisensäure zerstört war, blieb die zweite Silberfällung weiß und stellte nach der Analyse reines buttersaures Silber dar.

0,1168 g (im Porzellantiegel geglüht) ergaben 0,0650 Ag.

Berechnet für $C_4H_7O_2Ag : Ag = 55{,}38\,^0/_0$.
Gefunden : $Ag = 55{,}65\,^0/_0$.

Nachdem auf diese Weise die Bildung von Buttersäure aus Glutaminsäure festgestellt worden war, wurde unter Be-

[1]) Nach Vorschrift von E. Salkowski, Praktikum, 3. Auflage, 1906, S. 227.

rücksichtigung der quantitativen Verhältnisse folgender Versuch ausgeführt:

5,0 g Glutaminsäure wurden in 500 ccm Wasser gelöst und in der angegebenen Weise mit Natriumcarbonat und Fäulnislösung versetzt. Nach vierwöchentlichem Stehen bei 38° wurden 250 ccm der Flüssigkeit mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und unter gleichzeitiger direkter Erhitzung mit Wasserdampf destilliert. Das Abtreiben der flüchtigen Säuren nahm etwa 32 Stunden in Anspruch. Die Gesamtmenge des Destillates betrug 2655 ccm. Dasselbe gebrauchte zur Neutralisation 81,0 ccm $^{n}/_{5}$-NaOH.

Um Verluste durch Dissoziation zu vermeiden, wurden noch 19,0 ccm $^{n}/_{5}$-NaOH zugegeben und die gesamte Flüssigkeit in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade auf ca. 40 ccm eingeengt.

Die Lösung wurde nun in einen Rundkolben übergespült, mit 20,0 ccm Doppeltnormalschwefelsäure angesäuert, zur Zerstörung der Ameisensäure mit 4 g festem Mercurisulfat versetzt und eine halbe Stunde am Rückflußkühler in gelindem Sieden belassen. Unter deutlicher Kohlensäureentwicklung schied sich schwer lösliches Quecksilberoxydulsalz aus, das nach dem Erkalten abfiltriert wurde. Das in der Flüssigkeit befindliche Quecksilber wurde dann mit Schwefelwasserstoff ausgefällt, der absorbierte Anteil desselben durch einen kräftigen Luftstrom ausgetrieben, die Schwefelsäure darauf mit warmem Barytwasser und dessen Überschuß durch Einleiten von Kohlensäure entfernt. Die klare Lösung wurde nunmehr auf etwa 25 ccm eingeengt, wobei sich etwas Bariumcarbonat abschied. Unter Zugabe einiger Tropfen verdünnter Silbernitratlösung, die Spuren von Chloriden niederschlug, wurde aufgekocht und filtriert und dann mit konzentrierter Silbernitratlösung ausgefällt.

Der reichliche, feinkrystallinische Niederschlag wurde nach 2stündigem Stehen abgesaugt, mit kaltem Wasser und absolutem Alkohol ausgewaschen. Vor Licht geschützt schwärzte er sich nicht und bestand aus reinem Silberbutyrat. Die so isolierte Menge desselben betrug 1,93 g (= 0,878 g Buttersäure).

0,1077 g Substanz ergaben 0,0598 g Ag,

0,1711 „ „ „ 0,1556 g CO_2, 0,0523 g H_2O und 0,0949 g Ag (als Rückstand)

$C_4H_7O_2Ag$ berechnet: C = 24,62 %; H = 3,58 %; Ag = 55,38 %.
gefunden: C = 24,80 %; H = 3,39 %; Ag = 55,48 %
u. 55,44 %.

Um zwischen den beiden möglichen isomeren Buttersäuren zu entscheiden, wurde der Rest des Silberbutyrates in das Calciumsalz verwandelt. Letzteres zeigte die bekannten Eigenschaften des normalen Butyrates.

Die Ausbeute an Buttersäure betrug 58,6 % der Menge, die theoretisch aus Glutaminsäure entstehen kann. Bedenkt man, daß an den verschiedensten Stellen Verluste unvermeidlich sind, so ist die Buttersäurebildung aus Glutaminsäure als ein relativ glatt und reichlich verlaufender Vorgang zu bezeichnen.

Aus den Daten für die Gesamtacidität und für das schließlich isolierte buttersaure Silber konnte man einen ungefähren Rückschluß auf die Quantität der bei der Glutaminsäurefäulnis entstandenen Ameisensäure ziehen; ihre Menge betrug schätzungsweise ad maximum 36 % der Theorie (unter der Voraussetzung, daß 1 mol. Glutaminsäure 1 mol. Ameisensäure abspaltet).

Für die Bildung anderer Fettsäuren bei der Glutaminsäurefäulnis haben wir keinerlei Anhaltspunkte gefunden.

Die bei der Wasserdampfdestillation zurückgebliebene schwefelsaure Lösung der nicht flüchtigen Fäulnisprodukte wurde auf etwa 75 ccm eingeengt, mit Ammoniumsulfat nahezu gesättigt und einer erschöpfenden Extraktion im Zelmanowitzschen Apparat[1]) mit Äther unterworfen. Der innerhalb 52 Stunden erhaltene Ätherauszug hinterließ nach dem Verdunsten einen beinahe farblosen Rückstand, der beim Aufbewahren über Schwefelsäure bis zum nächsten Tage fast völlig krystallisierte. Durch Verreiben mit wenig kaltem Äther konnten die Krystalle isoliert werden. Ihre Menge betrug 0,043 g. Nach dem Umkrystallisieren aus heißem Wasser bildeten sie prismatische Nädelchen und zeigten den Schmelzpunkt 180 bis 181°; sie bestanden also aus Bernsteinsäure, deren Eigenschaften sie auch sonst aufwiesen. Glutarsäure, die durch einfache Desamidierung der Glutaminsäure hätte gebildet werden können, war nicht entstanden; sie schmilzt mehr als 80° niedriger (bei 97°) und bildet flache monokline Tafeln.

---

[1]) Diese Zeitschr. 1, 253, 1906.

Im Verlaufe dieser Untersuchungen hat sich herausgestellt, daß die Buttersäurespaltung der Glutaminsäure in verdünnten, etwa 1 %igen Lösungen allem Anscheine nach am vollständigsten vor sich geht. Denn die Fäulnis einer 5 %igen Lösung gab eine geringere Ausbeute an buttersaurem Silber. Auch hier wurde Glutarsäure im nicht flüchtigen Anteile vermißt und an statt ihrer eine ebenfalls geringere Menge Bernsteinsäure gefunden. Ein Teil der Glutaminsäure war hier übrigens unzerlegt geblieben (nach genauer Entfernung der Schwefelsäure mit Baryt usw. und Konzentration durch gasförmige Salzsäure fällbar).

Schließlich sei hier noch über einen Fäulnisversuch mit Glutarsäure selbst berichtet:

5 g Glutarsäure wurden mit Soda neutralisiert und in gleicher Weise wie die Glutaminsäure zur Fäulnis angesetzt. Es war jedoch nach Verlauf von nahezu drei Wochen beim Kochen mit verdünnter Schwefelsäure eine flüchtige Fettsäure aus der Fäulnislösung durch Destillation nicht zu erhalten. Von dem Gedanken ausgehend, daß vielleicht die Fäulnis in Gegenwart von Ammoniak leichter einträte, wurde eine zweite Portion Glutarsäure mit NH_3 neutralisiert usw., doch entstand auch bei diesem Versuche keine flüchtige Fettsäure.

Unter diesen Bedingungen scheint also Glutarsäure nicht zu Buttersäure zu werden, während Glutaminsäure durch die einfache Zelle der Fäulniserreger leicht diese Umwandlung erfährt. Die Glutaminsäure ist eines der häufigsten Spaltungsprodukte der Proteine, und es ist wahrscheinlich, daß sie nicht nur eine Quelle der Buttersäure bei der Fäulnis, sondern bei zahlreichen anderen Gärungsvorgängen ist, wo Eiweißstoffe oder ihre Spaltungsprodukte bez. deren Amide vorhanden sind und wo man Buttersäure antrifft. Neben der bekannten synthetischen Bildungsweise der Buttersäure aus stickstofffreiem Material, aus Zuckerarten sowie aus Glycerin und Milchsäure[1]), giebt es unzweifelhaft eine Entstehung durch Abbau stickstoffhaltiger Substanzen. Daß die Glutaminsäure über die Stufe der Buttersäure mit der β-Oxybuttersäure und den übrigen Acetonkörpern in Beziehung treten kann, ist selbstverständlich.

---

[1]) Vergl. E. Buchner u. J. Meisenheimer. Ber. d. deutsch. chem. Ges. 41, 1410, 1908.

Chemische Umwandlungen durch Strahlenarten.

I. Mitteilung.

Katalytische Reaktionen des Sonnenlichtes.

Von

Carl Neuberg.

(Aus der Chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

Die große Bedeutung des Lichtes für die Vorgänge im pflanzlichen und tierischen Organismus ist seit langem bekannt, die uralte therapeutische Verwertung der Strahlenarten wird wieder in den letzten Jahren besonders eifrig gepflegt. Trotz der unzweifelhaft feststehenden biologischen Wirkung des Lichtes — es sei nur an die Untersuchungen von Pfeffer, Engelmann, de Vries, v. Tappeiner und Jodlbauer, Straub, W. Ostwald u. a. erinnert — sind unsere Kenntnisse der sich dabei vollziehenden chemischen Reaktionen äußerst gering. Der Grund dafür liegt in dem Umstande, daß die direkte Lichtempfindlichkeit nur für verhältnismäßig wenige Substanzen einen solchen Grad erreicht, daß Veränderungen in kürzerer Zeit eintreten.

Es fehlt nicht an einzelnen Beobachtungen über chemische Lichtwirkungen; außer den photographischen Reaktionen sind seit Mitscherlich sowie Bunsen und Roscoe von Duclaux, C. Liebermann, W. Marckwald, C. Engler, Fenton, Stobbe, E. Schulze u. E. Winterstein, Sachs, Luther, Weigert u. a. entsprechende Befunde mitgeteilt worden. Die bedeutendste Erweiterung unserer Kenntnisse von den chemischen Lichtwirkungen verdanken wir aber in den letzten Jahren den Arbeiten von Ciamician und Silber. Jedoch selbst unter der Gunst der italienischen Sonne erfordert der Eintritt der von den beiden

bologneser Forschern beobachteten Umwandlungen durch das Licht in der Mehrzahl der Fälle Monate und sogar Jahre der Bestrahlung.

Für den Biologen bieten ein ungleich größeres Interesse solche Lichtreaktionen, die sich innerhalb von Minuten und Stunden vollziehen, d. h. innerhalb einer Spanne, in denen die physiologischen Strahlenwirkungen zustande kommen.

Es läßt sich nun für die organischen Verbindungen folgern, daß sie bei Zufuhr genügender Lichtenergie in Berührung mit der atmosphärischen Luft sämtlich photosensibel sein müssen. Daher war zu erwarten, daß bei Zusatz eines geeigneten Katalysators diese Lichtwirkung nachweisbar sein müsse.

In der Tat fand ich im Uranoxyd und seinen Salzen einen Stoff, der in zahlreichen Fällen zu dem gewünschten Ziele führt.

Im folgenden sei zunächst eine Übersicht über die mannigfachen Veränderungen gegeben, die ich im Sonnenlichte bei Gegenwart von Uranylverbindungen beobachtet habe.

Uranylsulfat, -acetat, -nitrat usw. oder eine Lösung von Uranoxyd in der zu untersuchenden Substanz können dabei benutzt werden.

Die Versuche sind sämtlich in wässeriger Lösung angestellt, um die Bedingungen so einfach wie möglich zu gestalten und komplizierte sekundäre Reaktionen mit dem Lösungsmittel auszuschließen, und zwar sind sie zumeist in der Weise vorgenommen, daß in 100 ccm Wasser, das $^1/_2$ bis 1 % Uransalz enthielt, 1 bis 5 g der betreffenden Substanz gelöst waren.

Die Flüssigkeiten wurden unter Lichtabschluß bereitet und in gewöhnlichen Glasgefäßen den Sonnenstrahlen exponiert, während Proben im Dunkelzimmer in einer locker schließenden Blechhülse aufbewahrt wurden. Eine zweite Kontrollreihe wurde ohne Zusatz von Uranverbindungen angesetzt.

Je nach der Intensität der Sonnenstrahlung und dem individuellen Verhalten der Substanz kann man in den belichteten uransalzhaltigen Proben in wenigen Minuten oder einigen Stunden den Eintritt beträchtlicher Veränderungen feststellen. Dieselben sind häufig von deutlichen Farbenumschlägen begleitet, indem die anfangs durch das Uransalz gelbgefärbten Flüssigkeiten blaugrün, grün, braun, orangerot oder schwarz werden; öfter kommt es auch zur Ausscheidung unlöslicher Uranverbindungen,

die ebenfalls alle Nuancen der erwähnten Farbenskala aufweisen können. Die Lösungen, die anfangs vollkommen geruchlos sind, nehmen dabei vielfach einen ausgesprochenen Geruch an (z. B. bei Alanin, Asparaginsäure, Camphersäure, Phenol- und Mentholglucuronsäure, Weinsäure, Äpfelsäure usw.) und enthalten dann neue, durch die Lichtwirkung entstandene Substanzen.

Die im Dunkeln aufbewahrten uranhaltigen Proben dagegen weisen weder Veränderungen der Farbe und des Geruches noch chemische Umwandlungen auf, selbst bei mehrwöchentlicher Aufbewahrung nicht.

Ebenso werden die uranfreien Lösungen im Sonnenlichte nicht angegriffen.

Dadurch sind die hier beschriebenen Erscheinungen als katalytische Lichtreaktionen gekennzeichnet.

Veränderungen einiger bei Gegenwart von Uransalzen gegen Sonnenlicht empfindlichen Substanzen.

Nr.	Ausgangssubstanz	Natur des bei der Belichtung entstandenen Körpers oder Angabe von Eigenschaften, welche das Reaktionsprodukt zum Unterschiede vom Ausgangsmaterial besitzt.
1.	Methylalkohol	Formaldehyd (Geruch, Farbenreaktionen, Diphenylendihydrazon).
2.	Äthylalkohol	Acetaldehyd (im Destillat Geruch, Reaktion von Rimini, Silberspiegel).
3.	Benzylalkohol	Benzaldehyd (Geruch und Phenylhydrazon im Destillat).
4.	Äthylenglykol	Glykolaldehyd (Phenylosazon, Reduktion von Fehlingscher Lösung in der Kälte), daneben Acetaldehyd und Spuren von Glyoxalsäure.
5.	Glycerin	Glycerose, vorwiegend Glycerinaldehyd (Glycerosazon, Reduktion von Fehlingscher Lösung schon in der Kälte, keine Resorcinprobe, positive Phloroglucinreaktion).
6.	m-Erythrit	Erythrose (Erythrosazon).
7.	Adonit	Pentosen (Pentosazon, Farbenreaktionen).
8.	d-Mannit	d-Mannose, schwache Seliwanoffsche Probe, reichlich Mannosehydrazon. Daneben tritt bemerkenswerterweise die Orcinreaktion auf, was auf einen weiteren Abbau hindeutet.

Nr.	Ausgangssubstanz	Natur des bei der Belichtung entstandenen Körpers oder Angabe von Eigenschaften, welche das Reaktionsprodukt zum Unterschiede vom Ausgangsmaterial besitzt.
9.	m-Inosit	Starke Reduktion von Fehlingscher Lösung. Positive Reaktion mit Naphtoresorcin[1]), die nach 24 Stunden wieder verschwindet.
10.	Quercit	Reduktion von Fehlingscher Lösung schon in der Kälte. Atypische grüne Naphtoresorcinreaktion.
11.	Aceton (aus der Bisulfitverb.)	Starke Reduktion von ammoniakal.-alkal. Silberlösung, die das Ausgangsmaterial nicht zeigt. Schwache Reduktion von Fehlingscher Lösung. Mit Naphtoresorcin in Äther unlösl. Fuchsinfärbung.
12.	d-Weinsäure	Glyoxal, ferner Ketosäuren, Reduktion von Fehlingscher Lösung in der Kälte. Außerordentlich starke Reaktion mit Naphtoresorcin. Die Flüssigkeit riecht nach Caramel und zugleich obstartig.
13.	d-Zuckersäure	Weinsäuredialdehyd (?), ferner Ketosäuren, positive Reaktion mit Orcin und Naphtoresorcin.
14.	Äpfelsäure	Reduktion von Fehlingscher Lösung schon in der Kälte, Geruch nach Karamel, anfangs positive, später negative Reaktion mit Naphtoresorcin. Mit Phenylhydrazin kleine Mengen vom Osazon der Oxybrenztraubensäure (bzw. des Mesoxalsäurehalbaldehyds).
15.	Fumarsäure	Reduktion von Fehlingscher Lösung in der Wärme, schwach positive Reaktion mit Naphtoresorcin.
16.	Maleinsäure	(wie 15.)
17.	Citronensäure	Reduktion von Fehlingscher Lösung; obstartiger Geruch.
18.	Essigsäure	Glyoxalsäure (Naphtoresorcinprobe, Reaktion mit Indol und Tryptophan), jedoch bei starkem Überschuß an Essigsäure erst nach 24 Stunden.

[1]) Unter positiver Naphtoresorcinreaktion ist hier und im folgenden stets die Bildung eines in Äther mit roter bis blauvioletter Nuance löslichen Farbstoffes verstanden, wie er nach B. Tollens (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 41, 1788, 1908) mit d-Glucuronsäure und nach J. A. Mandel und C. Neuberg (diese Zeitschr. 13, 148, 1908) auch mit anderen Aldehyd- sowie Ketosäuren erhalten wird.

Nr.	Ausgangssubstanz	Natur des bei der Belichtung entstandenen Körpers oder Angabe von Eigenschaften, welche das Reaktionsprodukt zum Unterschiede vom Ausgangsmaterial besitzt.
19.	d-Camphersäure (1:150). .	Reduktion von Fehlingscher Lösung in der Wärme. Nach wenigen Minuten der Belichtung tritt ein an Thujon und Menthon erinnernder Geruch auf; es scheidet sich beim Stehen ein grünes Salz aus. Beim Abdestillieren geht der riechende Körper in Form von Öltröpfchen über, die aus dem mit Ammonsulfat gesättigten Destillat sich als Schicht absetzen.
20.	d-Gluconsäure	Pentose, daneben Aldehyd- oder Ketosäure, die ein basisches orangefarbenes Bariumsalz gibt. Enorme Naphtoresorcinreaktion.
21.	Saccharin (Péligot)	Reduktion von Fehlingscher Lösung in der Kälte; mit Orcin plus Amylalkohol anfangs rote, später grüne Färbung, deren Spektrum im Rot und Gelb je einen scharfen Streifen aufweist.
22.	d, l-Milchsäure	Acetaldehyd.
23.	l-Xylose	l-Xyloson.
24.	d-Glucose	d-Glucoson, positive Pentosenreaktion mit Orcin (!).
25.	d-Fructose	Oson.
26.	Maltose	Maltoson (?), Traubenzucker.
27.	Rohrzucker	Inversion, daneben geringe Mengen von Oson.
28.	Raffinose	Inversion, daneben geringe Mengen von Osonen.
29.	α-Methylglucosid	Hydrolyse, Traubenzucker, d-Glucoson (?).
30.	Stärke	Reduzierende Kohlehydrate, stark positiver Ausfall d. typisch. Naphtoresorcinreaktion.
31.	Glykogen	Reduzierende Kohlehydrate.
32.	Inulin	d-Fructose neben wenig Oson.
33.	Urochloralsäure	Hydrolyse, Reduktion von Fehlingscher Lösung in der Kälte.
34.	Phenolglucuronsäure . . .	Hydrolyse, Reduktion von Fehlingscher Lösung in der Kälte, freies, schon am Geruche kenntliches Phenol, das aber offenbar z. T. weiter umgewandelt wird.
35.	Mentholglucuronsäure . . .	Hydrolyse, Reduktion von Fehlingscher Lösung in der Kälte. Bereits nach 2 Minuten der Belichtung tritt Mentholgeruch auf, nach 36 Stunden fällt Menthol krystallinisch aus. Bei längerem Stehen nimmt das Reduktionsvermögen wieder deutlich ab.

Nr.	Ausgangssubstanz	Natur des bei der Belichtung entstandenen Körpers oder Angabe von Eigenschaften, welche das Reaktionsprodukt zum Unterschiede vom Ausgangsmaterial besitzt.
36.	Amygdalin	Hydrolyse, Reduktion von Fehlingscher Lösung. Nach mehreren Minuten tritt schon der Bittermandelölgeruch stark auf.
37.	HCl-Glucosamin	Reduktion von Fehlingscher Lösung in der Kälte, schwache Orcinreaktion; starke, aber atypische Naphtoresorcinprobe mit schwachem schmalem Streifen im Rot und starkem im Grün, der mehr nach dem blauen Ende hin verschoben ist als das gewöhnliche Band.
38.	Glykokoll	Formaldehyd, Glyoxalsäure, Abspaltung von Ammoniak.
39.	d, l-Alanin	Acetaldehyd, Abspaltung von Ammoniak.
40.	d, l-α-Amino-n-buttersäure	Geruch nach Propionaldehyd, der nach einiger Zeit wieder verschwindet.
41.	Leucin (Gemisch der natürlichen Isomeren)	Valeraldehyd, Ammoniakabspaltung.
42.	d,l-Phenyl-aminoessigsäure	Geruch nach Benzaldehyd, der im Destillate erscheint.
43.	l-Asparaginsäure	Caramelgeruch, Ammoniakabspaltung, starkes Reduktionsvermögen gegenüber Fehlingscher Mischung u. ammoniakalischer Silberlösung; mit Phenylhydrazin Osazon der Oxybrenztraubensäure, daneben vielleicht Ketosäuren der 4-Kohlenstoffreihe.
44.	d-Glutaminsäure	Es fällt ein graugrüner Niederschlag aus, der Fehlingschen Lösung stark in der Wärme, gelinde schon in der Kälte reduziert. Schwache Naphtoresorcinprobe.
45.	d, l-Serin	Starke Reduktion von Fehlingscher Lösung schon in der Kälte, Abspaltung von Ammoniak, positive Naphtoresorcinprobe.
46.	d, l-Isoserin	Starke Reduktion von Fehlingscher Lösung schon in der Kälte.
47.	l-Cystin (gelöst in HCl) . .	Reduktion von Fehlingscher Lösung, Naphtoresorcinreaktion angedeutet.
48.	l-Tyrosin (gelöst in HCl) .	Reduktion von heißer Fehlingscher Lösung.

Nr.	Ausgangssubstanz	Natur des bei der Belichtung entstandenen Körpers oder Angabe von Eigenschaften, welche das Reaktionsprodukt zum Unterschiede vom Ausgangsmaterial besitzt.
49.	Histidindichlorid	Schwache Reduktion von ammoniakalisch-alkalischer Silberlösung; beim Erwärmen mit Fehlingscher Mischung weißer Niederschlag, während die überstehende Flüssigkeit bei vorsichtiger Zugabe der Kupferlösung eine biuretähnliche Farbe annimmt.
50.	Tryptophan	Flüchtiger, aldehydähnlicher Körper der Indolreihe (Indylacetaldehyd?).
51.	HCl-Äthylendiamin	Schwacher Silberspiegel, atypische Naphtoresorcinprobe mit fuchsinartiger Farbe und Fluorescenz sowie undeutlichem, schmalem Streifen in Grün.
52.	HCl-Guanin	Vorübergehend fällt die Naphtoresorcinprobe positiv aus, später jedoch negativ.
53.	Lecithin	Reduktion von Fehlingscher Lösung, schwache Orcinreaktion, Zunahme der Acidität.
54.	Triolein (Emulsion unter Zusatz von etwas ölsaurem Natron)	Reduktion von Fehlingscher Lösung, positive Orcinreaktion, Zunahme der Acidität.
55.	Adrenalin	Färbt sich im Licht schneller braun als die Dunkelprobe und läßt im Gegensatz zu dieser bald einen schwarzen flockigen Niederschlag ausfallen.
56.	Inositphosphorsäure (Phytinnatrium mit HCl angenähert neutralisiert) .	Reduktion von Fehlingscher Lösung.
57.	Glycerinphosphorsäure . .	Reduktion von Fehlingscher Lösung.
58.	Inosinsäure	Reduktion von Fehlingscher und alkalisch-ammoniakalischer Silberlösung.
59.	Hefenucleinsäure	Schwache Reduktion von Fehlingscher Lösung.
60.	Milznucleinsäure	Schwache Reduktion von Fehlingscher Lösung.
61.	Seidenfibroinpepton	Acetaldehyd, Abspaltung von Ammoniak, Reduktion von ammoniakalischer Silberlösung in der Kälte.
62.	Gelatine	Aldehyde, Abspaltung von Ammoniak. Reduktion von alkalischer Silberlösung in der Kälte, positive Naphtoresorcinreaktion.

Wie man sieht, erstrecken sich die durch das Sonnenlicht bei Gegenwart von Uransalzen hervorgerufenen Veränderungen auf Substanzen vom allerverschiedensten Bau. Bei diesen Umwandlungen[1]), die vorläufig in erster Linie an physiologisch wichtigen Verbindungen untersucht wurden, tritt häufig nicht einfach ein einziges neues Derivat auf, sondern es werden gleichzeitig oder nacheinander mehrere gebildet (z. B. bei Aethylenglykol, Weinsäure, Zuckersäure, Glykokoll). Es haben sich auch Anzeichen dafür ergeben, daß die zunächst entstandenen Produkte einer weiteren Umwandlung anheimfallen (z. B. bei Phenol- und Mentholglucuronsäure, α-Amino-n-buttersäure, Guanin u. a.). Andererseits wird gelegentlich die Anstellung der Versuche dadurch erschwert, daß Uransalze die wässerigen Lösungen des Ausgangsmaterials oder die ersten Produkte einer Umwandlung ausfällen, wie es bei den Eiweißstoffen (Gelatine), den Nucleinsäuren und gepaarten Phosphorsäuren sowie bei Glykogen und Stärke in mehr oder minder störendem Grade eintreten kann. Man muß sich hier mit dem in Lösung gebliebenen Teile begnügen oder nach Möglichkeit eine Wiederauflösung der Fällung durch vorsichtigen Zusatz von freien Mineralsäuren vornehmen, die jedoch die Lichtreaktion beeinträchtigen.

Die Wirkung der Uranverbindungen im Sonnenlichte stellt sich im großen und ganzen als ein Oxydationsvorgang dar. Die sauerstoffübertragende Wirkung der Salze eines Metalles im Sonnenlicht ist bereits bekannt, nämlich beim Eisen. H. de Vries hat sie bei Pflanzensäuren beobachtet, die Feststellung der Natur der dabei entstehenden Umwandlungsprodukte war für seine damalige pflanzenphysiologische Fragestellung ohne Bedeutung. H. J. H. Fenton und O. Ruff streiften dann gelegentlich anderer Untersuchungen die chemischen Seite dieses Vorganges. Ersterer beobachtete eine Einwirkung auf einfache aliphatische Hydroxylverbindungen, letzterer auf die Monocarbonsäuren der Zuckerreihe. Beide Autoren wurden bei den präparativen Zwecken, die sie in erster Reihe verfolgten, dazu geführt, die meist schwache Wirkung von atmosphärischem Sauerstoff und Sonnenlicht durch das von letzterem unabhängige, kräftig oxydierende Wasserstoff-

---

[1]) Uransalze dienen als analytisches Hilfsmittel bei der polarimetrischen Untersuchung schwach drehender Substanzen, da sie in vielen Fällen das Drehungsvermögen zu steigern imstande sind (Walden, Großmann). Angesichts der Lichtempfindlichkeit der uranhaltigen Lösungen ist es nicht ausgeschlossen, daß gelegentlich auch chemische Umwandlungen bei den Drehungsänderungen mit im Spiele sein können.

superoxyd zu ersetzen und auf eine Zufuhr von Lichtenergie überhaupt zu verzichten.

Bei den Oxysäuren, zu denen die wichtigen natürlichen Pflanzensäuren zählen, hat der Effekt der Uran-Lichtkatalyse einige Ähnlichkeit mit der Wirkung des elektrischen Stromes. Wie jüngst von Neuberg mitgeteilt wurde, erzeugt er aus diesen Substanzen nämlich ebenfalls Aldehyde und daneben Aldehyd- oder Ketosäuren.

Das Verhalten von stickstoffhaltigen Substanzen im Sonnenlichte bei Gegenwart von Uransalz ist recht bemerkenswert. Die kombinierte Uran-Sonnenlichtwirkung auf Aminosäuren und Proteine (siehe im folgenden) führt unter Desamidierung zu Aldehydverbindungen, hat also gleichfalls mit der Wasserstoffsuperoxydreaktion Ähnlichkeit. Denn dieselbe ergibt, wie zuerst Neuberg und Blumenthal, Orgler und später Dakin festgestellt haben, ebenso unter Ammoniakabspaltung Aldehyde und andere Carbonylverbindungen.

Mit einem etwaigen Gehalte der Uranverbindungen an Radiumsalzen haben übrigens die beschriebenen Lichtwirkungen nichts zu tun. Das folgt einmal daraus, daß die Erscheinungen im Dunkeln[1]) ausbleiben, deutlich von der Intensität der Sonnenstrahlung abhängen und andrerseits unter dem Einflusse von starken Radiumpräparaten nicht eintreten. Auch die bekannte Phosphorescenz, Luminescenz und Fluorescenz fester Uransalze spielt bei den vorliegenden Lichtwirkungen kaum mit. Die Fähigkeit, zu fluorescieren, macht sich in den verdünnten wässerigen Lösungen kaum geltend, und typische Fluorescenzerreger, wie Fluorescein usw., bringen die beschriebenen Reaktionen nicht zustande. Nicht unerwähnt bleibe, daß eine durch Uransalze ausgelöste Lichtwirkung seit fast 50 Jahren bekannt ist. Seekamp[2]) beobachtete in Urugay, daß die mit einem Uranoxydsalze versetzten Lösungen von Säuren der Oxalsäurereihe im Lichte 1 Molekül Kohlensäure verlieren. Er gibt an, daß Oxalsäure zu Ameisensäure, Bernsteinsäure zu Propionsäure, Glutarsäure zu Buttersäure werde. Daß dabei die Fettsäuren selbst weiter umgewandelt werden können (siehe die Essigsäure), ist ihm entgangen.[3]).

---

[1]) Eine mit Uransulfat versetzte Weinsäurelösung, die im direkten Sonnenlichte bereits nach 2 Minuten Fehlingsche Lösung reduziert, bleibt im völligen Dunkel länger als 4 Wochen gänzlich unverändert. Ebenso verhalten sich uransalzhaltige Lösungen von Glycerin usw.

[2]) Ann. d. Chem. 122, 113, 1862 und 133, 253, 1865.

[3]) Die Reduktion von Uranisulfat zu Uranosulfat in starker Äthylenglykollösung durch Sonnenlicht beobachtete gelegentlich anderer, rein anorganischer Studien Oechsner de Coninck (Bull. Acad. royal belgique 1905, 360). Von einer Umwandlung des Glykols selbst berichtet der Autor nichts. Die Veränderlichkeit von wässerigen Uranylacetatlösungen am Licht ist eine alte Laboratoriumserfahrung; (deshalb werden die zur Phosphorsäuretitration dienenden Uranylsalzlösungen in dunkelen Flaschen aufbewahrt). Die Uranylverbindung reduziert sich am Licht zu einem Gemisch von Urano- und Uranihydroxyd (A. Bach, H. Euler).

Im einzelnen können die durch die katalytische Uranwirkung im Sonnenlichte hervorgerufenen Umwandlungen recht verschieden sein. Für bestimmte Gruppen von Substanzen lassen sich immerhin schon jetzt einige Gesetzmäßigkeiten erkennen.

1. Alkohole werden zu Aldehyden.

2. Polyalkohole werden zu Oxyaldehyden oder Oxyketonen.

3. Säuren werden zu Aldehyd- und Ketoverbindungen, die teils eine gleiche C-Atomenzahl besitzen, teils kohlenstoffärmer als das Ausgangsmaterial sind.

4. Monosaccharide werden z. T. in Osone verwandelt.

5. Disaccharide werden invertiert.

6. Polysaccharide werden hydrolysiert.

7. Glucoside werden hydrolytisch gespalten.

8. α-Aminosäuren werden unter Loslösung von Ammoniak[1]) in die in ein Kohlenstoffatom ärmeren Aldehyd umgewandelt. (Aldehydspaltung der Aminosäuren.) Analog ist die Veränderung des Oxyaminosäuren. Amino-dicarbonsäuen gehen in in Aldehydsäuren über, z. T. ebenso verhält sich das Glykokoll.

9. Glyceride (Fette) werden partiell verseift.

10. Für die gepaarten Phosphorsäuren hat sich, soweit sie sich von Polyhydroxylverbindungen ableiten (Glycerinphosphorsäure, Inositphosphorsäure), eine Umwandlung ähnlich derjenigen der zugrunde liegenden organischen Bestandteile nachweisen lassen.

11. Peptone und Proteine werden offenbar zunächst teilweise hydrolysiert und die Aminosäuren dann in Aldehyde bez. Aldehydsäuren übergeführt.

Diese Umwandlungen, neben denen sich aber auch noch

Über das Schicksal der Essigsäure bei diesem Vorgange liegen keine Angaben vor. Da Essigsäure zu Glyoxalsäure wird (siehe die Tabelle), so reduziert eine hinreichend belichtete Lösung von essigsaurem Uran direkt schwach die Fehlingsche Mischung.

[1]) Ähnlich scheinen sich Säureamide zu verhalten. Belichtete Harnstofflösungen enthalten Ammoniak und daneben eine Fehlingsche Lösung schwach reduzierende Substanz. Imidverbindungen, wie sie in den Purinen vorliegen, bieten durch ihre geringe Löslichkeit der Untersuchung Schwierigkeiten. Beim Guaninchlorhydrat konnte eine intermediäre Bildung von Glyoxalsäure in kleiner Menge wahrscheinlich gemacht werden.

andere abspielen können, sind recht charakteristich. Sie zeigen, daß dem Sonnenlichte in Gegenwart des Katalysators eine ausgesprochen spaltende Wirkung eigen ist. Dieselbe äußert sich nicht nur in einer Hydrolyse von Polysacchariden, Fetten und Eiweißkörpern, sondern auch in der Veränderung einfacher Körper möglichst unter Molekülverkleinerung, wobei Loslösung von Amino- und Carboxylgruppen und Oxydationen erfolgen.

Besonders auffallend ist die in den angeführten Beispielen überall zutage tretende Tendenz des Lichtes, aus zahlreichen indifferenten Stoffen des Tier- und Pflanzenorganismus carbonylhaltige Substanzen, Aldehyd- oder Ketoverbindungen, zu erzeugen, deren Reaktionslust und Befähigung zu den wichtigsten Synthesen allbekannt ist.

Beachtenswert sind weiter die folgenden Punkte. Diese in Gegenwart von Uransalzen bei direkter Sonnenstrahlung eintretenden Veränderungen, die im Dunkeln ausbleiben, kommen größtenteils auch im diffusen Tageslichte zustande, allerdings weniger schnell, schätzungsweise 50 bis 100 mal langsamer. Analog den Uranverbindungen wirken schließlich auch andere Schwermetallsalze, von denen jedoch keines die Stärke der Uranverbindungen zu erreichen scheint. Abgesehen davon, daß das Uran in kleinen Mengen in der Natur weit verbreitet ist, dürfte es im Organismus der Pflanzen und Tiere nicht an ähnlichen, die Lichtenergie in kürzester Zeit übertragenden, Katalysatoren fehlen.

Diese schnell verlaufenden Lichtwirkungen sind im Gegensatz zu den langsam, über Jahr und Tag sich vollziehenden und deshalb physiologisch wenig bedeutungsvollen wohl im stande, ein Verständnis der beim Heliotropismus und beim Phototropismus sich abspielenden chemischen Vorgänge anzubahnen und vielleicht einen Einblick in den Chemismus der allgemeinen Wirkung des Sonnenlichtes auf den pflanzlichen und tierischen Organismus zu verstatten. Im Zusammenhange hiermit sei erwähnt, daß von den therapeutisch wichtigen Strahlenarten die der Finsen- und Quarzlampe ähnlich wie das Sonnenlicht die Urankatalyse erregen und analoge Umwandlungen zu Wege bringen.[1]) Das weitere Studium der letzteren bei künstlichen Lichtquellen

[1]) Das Licht des Auerstrumpfes und der elektrischen Glühlampe ist nur von recht schwacher Wirkung.

und physiologische Versuche in der angedeuteten Richtung sollen vorbehalten bleiben.

Die Analogie mit der Tätigkeit gewisser Oxydasen, decarboxylierender, desamidierender und hydrolysierender Enzyme liegt nahe; es ist auch zu prüfen, ob die wirklichen Fermentvorgänge, die durch Sonnenlicht meist gehemmt werden, unter Umständen durch dasselbe nicht auch gefördert werden können, wie ich es früher für Radiumstrahlen gezeigt habe.

Die bisherigen Versuche sind bei der Lufttemperatur (ungefähr zwischen 12° und 27°) in verkorkten Glasgefäßen ausgeführt. Der Einfluß des atmosphärischen Sauerstoffes, der Temperatur und der Absorption von Strahlen bestimmter Wellenlänge auf die kombinierte Wirkung von Sonnenlicht und Uransalzen ist noch festzustellen.

Bei der Fülle des experimentellen Materials und den wechselnden Witterungsverhältnissen konnten die quantitativen Beziehungen bei diesen Vorgängen bisher noch nicht in allen Fällen festgestellt werden. Über einige derselben sei im folgenden berichtet.

a) Glycerin.

5,0 g wasserfreies Glycerin wurden mit 100 ccm Wasser gemischt und 0,8 g Uranylsulfat darin gelöst. Die Flüssigkeit wurde 6 Stunden im Juni ununterbrochen dem direkten Sonnenlichte ausgesetzt.

Nach dieser Zeit war das Reduktionsvermögen, das übrigens nach 5 Minuten der Belichtung bereits deutlich nachweisbar ist, gleich dem einer 2,1 % Traubenzuckerlösung. Da die Zucker der 3-Kohlenstoffreihe[1]) angenähert dasselbe Reduktionsvermögen wie die d-Glucose besitzen, so ergibt sich daraus eine Umwandlung des Glycerins zu 42 %.

Beim Stehenlassen mit essigsaurem Phenylhydrazin im Brutschranke erhält man leicht Phenylglycerosazon, das aus heißem Benzol umkrystallisiert bei 130 bis 131° schmolz.

$C_{15}H_{16}N_4O$: Berechnet N = 20,89 %,
Gefunden N = 21,15 %.

Daß durch die Lichtwirkung hauptsächlich Glycerinaldehyd

[1]) A. Wohl, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 31, 1800, 1898 und O. Piloty, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 30, 3165, 1897.

und nicht Dioxyaceton entsteht, ist schon in der tabellarischen Übersicht angegeben.

b) Weinsäure.

5,0 g d-Weinsäure wurden in 100 ccm Wasser zusammen mit 0,5 g Uranoxyd in einem Glaskolben gelöst. Bereits nach einer 2-minütigen Belichtung mit direktem Sonnenlicht reduzierte die alkalisch gemachte Flüssigkeit die Fehlingsche Mischung. Nach 8 stündiger Einwirkung einer unbewölkten Julisonne entsprach das Reduktionsvermögen einem Gehalte an 1,4 % Traubenzucker.

Aus 50 ccm der Flüssigkeit, die bald einen intensiven obstartigen und zugleich an Caramel erinnernden Geruch annimmt, wurden beim gelinden Erwärmen mit einer essigsauren-alkoholischen Lösung von p-Nitrophenylhydrazin 1,30 g typisches Glyoxal-p-nitrophenylosazon erhalten, das fast ohne Verlust aus der Lösung in heißem Pyridin durch Toluol wieder ausgefällt werden konnten.

$C_{14}H_{12}N_6O_4$: Ber. C = 51,22; H = 3,66; N = 25,61 %,
Gefunden C = 50,95; H = 3,87; N = 25,76 %.

Die fast momentane Bildung des Osazons zeigt, daß Glyoxal CHO — CHO und nicht Glykolaldehyd CH_2OH — CHO in der Lösung vorhanden ist. Daneben sind jedoch noch Ketosäuren zugegen (siehe die Tabelle), welche eine intensive Naphtoresorcinprobe geben.

c) Alanin.

4,4 g d,l-Alanin wurden in 100 ccm Wasser gelöst, mit 0,8 g Uranylsulfat versetzt und im verkorkten Glaskolben in die Sonne gestellt. Nach 10 Minuten langer Belichtung schlägt die gelbe Farbe in Grün um, und gleichzeitig tritt deutlich der Geruch nach Acetaldehyd auf. Die Dauer der Einwirkung der Sonnenstrahlen betrug ca. $7^1/_2$ Stunde, dann stand das Gefäß bis zum nächsten Vormittage im zerstreuten Himmelslichte.

Durch Destillation von 25 ccm der nicht filtrierten, durch Ausscheidung eines basischen Salzes getrübten Flüssigkeit mit Magnesia wurde der Gehalt an abgespaltenem Ammoniak bestimmt. Dasselbe betrug, auf die Gesamtquantität berechnet, 0,0935 g, d. h. ca. 11,2 % der theoretisch möglichen Menge.

Die restierenden 75 ccm dienten zum Nachweise des ent-

standenen Acetaldehyds. Um den an Ammoniak gebundenen Teil nicht zu verlieren, wurde mit verdünnter Schwefelsäure schwach angesäuert — dabei wird die Flüssigkeit wieder völlig klar — und am absteigenden Kühler übergetrieben. Das Destillat besaß intensiven Geruch nach Acetaldehyd, ergab mit alkalisch-ammoniakalischer Silberlösung einen prächtigen Silberspiegel, färbte sich mit Nitroprussidnatrium und einem Tropfen Diäthylamin intensiv blau (Reaktion von Rimini). Durch Behandlung mit p-Nitrophenylhydrazin und nach mehrfachem Umkrystallisieren des Rohproduktes aus heißem Ligroïn wurden 0,965 g Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazon erhalten.

d) Asparaginsäure.

Die Bildung eines Fehlingsche Lösung bereits in der Kälte, enorm in der Wärme reduzierenden Produktes aus der Asparaginsäure durch den lichtkatalytischen Prozeß ist von besonderem Interesse.

Es wurden 4,0 g Asparaginsäure unter Zusatz von 0,8 g Uranylsulfat in 100 ccm Wasser gelöst. Bald nach der Bestrahlung stellt sich zugleich mit den reduzierenden Eigenschaften ein sowohl an Obst als Caramel erinnernder Geruch ein.

Wie bei den übrigen Aminosäuren ließ sich auch hier eine Ammoniakabspaltung konstatieren. Das Reduktionsvermögen scheint auf der Gegenwart verschiedener Substanzen zu beruhen, von denen eine in Form ihrer Phenylhydrazinverbindung isoliert werden konnte. Nach mehrfachem Umkrystallisieren der Rohosazone erst aus verdünntem Alkohol, dann aus Benzol wurden 0,84 g einer Verbindung erhalten, die bei 206° bis 207° schmolz, und alle Eigenschaften des Oxybrenztraubensäureosazons von E. Fischer und Nastvogel sowie von Will:

$$CH:N.NHC_6H_5-C:N\ NHC_6H_5-COOH \quad \text{besaß.}$$

$$C_{15}H_{14}N_4O_2: \text{Ber. } N = 19{,}86\ \%,$$
$$\text{Gefunden } N = 19{,}94\ \%.$$

Über die Natur der zugrunde liegenden reduzierenden Säure läßt sich aus dem Osazon vorläufig nichts sicheres folgern. Neben derselben scheint noch eine reduzierende Säure der 4-Kohlenstoffreihe, Dioxoweinsäure COOH — CO — CO — COOH, oder die

Monooxyweinsäure von Fenton COOH—CO—CHOH—COOH, zugegen zu sein, was noch näher festzustellen ist.

e) Seidenfibroinpepton.

Wie erwähnt, bietet die Untersuchung des Verhaltens mancher Eiweißkörper bei der Lichtreaktion insofern Schwierigkeiten, als Uransalze und Proteine einander vielfach ausfällen. Es war daher wertvoll, in dem von E. Fischer gemeinsam mit Abderhalden und Bergell untersuchten Seidenfibroinpepton ein geeignetes Material zu besitzen.

Die Lösung von 5,0 g Seidenfibroinpepton in 100 ccm Wasser nimmt 1 g Uranylsulfat auf, ohne daß eine Fällung erfolgt. In der Sonne färbt sich die Mischung bald braun, und es kommt zu Abscheidung eines fast schwarzen Niederschlages, der vorläufig nicht näher untersucht worden ist. Die nach 12stündiger Bestrahlung davon abfiltrierte Flüssigkeit ist hellgelb. Auf Zusatz von Fehlingscher Lösung tritt die Biuretfärbung auf, trotz derselben kann man nach dem Erhitzen das Ausfallen von Kupferoxydul erkennen. Ferner hat die Flüssigkeit die Fähigkeit angenommen, aus ammoniakalisch-alkalischer Silberlösung schon in der Kälte fast momentan einen Silberspiegel abzuscheiden. Sie riecht deutlich nach Aldehyden.

50 ccm der nicht filtrierten Flüssigkeit wurden mit verdünnter Schwefelsäure schwach angesäuert und lieferten ins Destillat ein Gemisch von Aldehyden, die durch die üblichen Reaktionen nachgewiesen wurden. Im einzelnen wurde Acetaldehyd durch die Riminische Reaktion, Formaldehyd mittels Dihydrazinodiphenyl erkannt. Mit essigsaurem p-Nitrophenylhydrazin entstand ein Gemisch halb fester, halb flüssiger Hydrazone.

In 30 ccm wurde durch Destillation mit Magnesia der Gehalt an durch Desamidierung gebildetem Ammoniak ermittelt; er betrug 0,0204 g, d. h. 1,36 % vom Gewichte des Ausgangsmaterials.[1])

---

[1]) Ähnlich verläuft die Einwirkung von Sonnenstrahlen und Uransalz auf Gelatine. Es ist wohl möglich, daß die bekannten Veränderungen der Chromgelatine am Lichte z. T. auf ähnliche Weise zustande kommen.

f) Inulin.

2,5 g Inulin wurden zusammen mit 1 g Uranylsulfat in 100 ccm Wasser gelöst. Bei intensiver Belichtung stellt sich schnell Reduktionsvermögen ein, nach 8 Stunden entsprach es einem Gehalt von ziemlich genau 1 g Fruchtzucker in 100 ccm der Lösung, d. h. es waren rund 40% Inulin hydrolysiert.

Aus 40 ccm wurde sodann mit essigsaurem Phenylhydrazin das Osazon bereitet. Beim Erwärmen auf 38° fielen innerhalb 5 Minuten 0,045 g Osazon aus, deren schnelle Bildung etwas vorhandenem Oson zuzuschreiben ist. Die Hauptmenge schied sich erst bei $1^1/_2$stündigem Erwärmen im siedenden Wasserbade ab. Nach dem Umkrystallisieren aus verdünntem Alkohol wurde 1,08 g reines d-Glucosazon erhalten, das schnell erhitzt bei 209° schmolz.

$$C_{18}H_{22}N_4O_4: \text{ Ber. } N = 15{,}64\,\%,$$
$$\text{Gef. } N = 15{,}87\,\%.$$

Der Eintritt der Hydrolyse zu Fruchtzucker wurde auch durch die Gärungsprobe kontrolliert.

Vor der Ausführung derselben wurden 15 ccm der Flüssigkeit von Uransalzen und Schwefelsäure durch Zugabe von Barytwasser befreit und dessen Überschuß genau durch kalte verdünnte Schwefelsäure entfernt. Diese Lösung wurde durch Hefe schon in einer Stunde in lebhafte Gärung versetzt.

Die Untersuchungen werden nach verschiedenen Richtungen fortgesetzt.

Über das Verhalten des arsenparanucleïnsauren Eisens und der arsenigen Säure im Organismus.

Von

E. Salkowski.

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität zu Berlin.)

(Eingegangen am 4. August 1908.)

In Nr. 4, 1808 der Berl. klin. Wochenschr. habe ich eine Phosphor und Arsen enthaltende Eisenverbindung beschrieben, welche ich durch Fällung einer arsenhaltigen Pepsinverdauungslösung des Caseins mit Ferriammonsulfat erhalten habe. An der bezeichneten Stelle habe ich die Gründe erörtert, welche mich bestimmen, diese Fällung nicht als ein Gemisch von Ferriarseniat und paranucleïnsaurem Eisen, sondern in der Tat als eine chemische Verbindung anzusehen. Die dort aufgeführten Gründe waren — abgesehen von der konstanten Zusammensetzung, die nicht absolut beweisend ist, da stets unter denselben Bedingungen gearbeitet wurde — die Löslichkeit der Verbindung in schwacher Alkalilösung (0,2$^0/_0$ Na_2CO_3), in welcher arsensaures Eisenoxyd unlöslich ist, und das Verhalten dieser Lösung bei der Dialyse: es ging dabei keine Arsensäure (auch nicht arsenige Säure) in das Dialysat über, oder doch nur äußerste Spuren. Es schien mir nun von Interesse, das Verhalten der alkalischen Lösung im Organismus zu untersuchen. Ergab sich, daß die Verbindung in erheblichem Maße vom Magendarmkanal aus resorbiert wird, so war damit eine weitere Stütze für die Ansicht gewonnen, daß es sich in der Tat um eine chemische Verbindung handelt, da das Ferriarseniat allgemein als nicht resorbierbar angesehen wird, gilt ja doch das Eisenoxydhydrat für sich oder im Gemisch mit Magnesium-

hydrat noch heute als Gegenmittel bei Vergiftung mit arseniger Säure oder Arsensäure. Ich habe bei den Versuchen das Hauptgewicht auf die Untersuchung des Harnes gelegt, da der Arsengehalt des Kotes naturgemäß keinen Aufschluß darüber gibt, wieviel von dem in ihm gefundenen Arsen als nicht resorbiert, wieviel als auf der Darmschleimhaut wieder ausgeschieden anzusehen ist, nachdem A. Heffter[1]) festgestellt hat, daß eine solche Ausscheidung durch die Darmschleimhaut nach subcutaner Injektion von arsenigsaurem Natron in der Tat stattfindet. War diese Ausscheidung in den Versuchen von Heffter auch nur gering (etwa 4°/₀ des eingespritzten Arsens), so war doch nicht auszuschließen, daß sie bei den von mir gewählten Versuchstieren (Kaninchen, während Heffter Hunde benutzt hat) vielleicht größer sein konnte. — Was die zum Nachweis des Arsens angewendeten Methoden betrifft, so verweise ich auf meine in der Zeitschr. f. physiol. Chemie[2]) erschienene Arbeit über den Nachweis des Arsens im Harn. Nicht in allen Versuchen ist dieselbe Methode benutzt, in einzelnen mehrere Methoden nebeneinander; in der Beschreibung der Versuche ist dieses jedesmal besonders angegeben worden. Ich berichte zunächst nur über die qualitativen Ergebnisse, die quantitativen Verhältnisse sollen weiter unten im Zusammenhang besprochen werden.

Versuch I.

Kaninchen von 2200 g Körpergewicht, Fütterung mit Kohl und Hafer. Lösung von arsenparanucleïnsaurem Eisen[3]), welche in 100 ccm 0,035 g As enthält. Das Tier erhält von dieser Lösung mit der Schlundsonde

[1]) Arch. internat. de Pharmacodynamie et de Thérapie 1905, 402.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem., 56, 95. — Nach dem Erscheinen dieser Arbeit sind mir durch die Freundlichkeit der betr. Autoren zwei Arbeiten über den Nachweis des Arsens zugegangen: 1. G. Lockemann, Zeitschr. f. angew. Chem. 1905, 416; 2. Kasimir Strzyowski, Österr. Chem.-Zeitg. 1904, Nr. 4, welche mir leider entgangen waren. Auch in der vorliegenden Mitteilung habe ich diese Arbeiten nicht benutzen können, da meine Versuche bis auf Kleinigkeiten abgeschlossen waren, als ich die Abdrücke erhielt, für deren Übersendung ich den Herren Lockemann und Strzyzowski zu bestem Dank verpflichtet bin.

[3]) Für die Folge der Kürze halber mit A. P. E. bezeichnet.

am 30./7. 07: 10 ccm + 15 Wasser = 0,0035 As,
„ 31./7. 07: 15 „ + 10 „ = 0,0047 „
„ 1./8. 07: 20 „ + 5 „ = 0,007 „

also im ganzen an 3 Tagen 0,0152 g As (= 0,020 g As_2O_3).

Das Kaninchen zeigte zu keiner Zeit Krankheitserscheinungen, die Freßlust war nicht merklich vermindert. Der Harn wurde in 3 Portionen gesammelt:

1. Periode, abgeschlossen am 5./8. 07 = 6 Tage = 960 ccm,
2. „ „ „ 9./8. 07 = 4 Tage = 1840 „
3. „ „ „ 10./8. 07 = 1 Tag = 400 „

Zur Untersuchung auf Arsen wurde von dem Harn der ersten Periode $^1/_6$ genommen, von dem der zweiten Periode $^1/_4$, der dritte Harn ganz, also stets der Harn eines Tages untersucht.

Zum Nachweis wurde der eingedampfte Harn in der üblichen Weise mit Salzsäure + chlorsaurem Kali behandelt, das Chlor resp. niedrige Oxydationsstufen möglichst durch Abdampfen entfernt, dann mit dem Marshschen Apparat auf Spiegelbildung untersucht.

Der Harn der 1. Periode gab starken Arsenspiegel,
„ „ „ 2. „ „ mäßig starken Arsenspiegel,
„ „ „ 3. „ „ Spuren von Arsenspiegel.

Die Ausscheidung ist also anscheinend am 8. Tage nach der letzten Dosis schon fast ganz beendigt.

Die Kotentleerung wurde in Arbeit genommen am 5./8. = 6 Tage und am 9./8. = 4 Tage.

Die gesamte Kotentleerung von I wurde in der Reibschale mit verdünnter Salzsäure verrieben, dann längere Zeit auf dem Wasserbad im Kolben erhitzt, aufs neue verrieben und abgenutscht. Der salzsaure Auszug wurde mit einem Gemisch von NaOH und Na_2CO_3 schwach alkalisiert: ziemlich reichlicher Niederschlag, der sich indessen schlecht absetzt. Zur Beförderung des Absetzens wird $^1/_2$ Vol. Alkohol hinzugesetzt, filtriert, der Niederschlag ausgewaschen.

a) Der hauptsächlich aus Calciumphosphat bestehende Niederschlag wurde in Salzsäure gelöst, die Lösung mit $KClO_3$ behandelt usw.: kein Arsenspiegel.

b) Das ganze Filtrat wurde mit Salzsäure + $KClO_3$ behandelt usw.: deutlicher, aber ziemlich schwacher Arsenspiegel.

Kot der Periode II ebenso behandelt: kein Arsenspiegel.

Versuch II.

Kaninchen von 2050 g Körpergewicht, Fütterung mit Kohl und Hafer. Lösung von A. P. E. in 0,2% Na_2CO_3, die in 100 ccm 0,05 As enthielt. Das Tier erhielt am 8., 9, 10., 11/11. 1907 je 10 ccm + 15 ccm Wasser in den Magen, im ganzen also 40 ccm = 0,02 As = (0,0264 As_2O_3).

Das Tier frißt etwas schlechter, am 13. aber schon wieder ganz gut.

Der Harn wurde in 3 Portionen gesammelt:

Periode I, abgeschl. am 14. = 6 Tage = 1080, also pro Tag 180 ccm,
„ II, „ „ 16. = 2 „ = 600, „ „ „ 300 „
„ III, „ „ 17. = 1 „ = 300 ccm.

Es wurde stets die einem Tage entsprechende Quantität Harn untersucht.

180 ccm Harn der Periode I wurde in der üblichen Weise mit KCl + $KClO_3$ behandelt: nur mäßig starker Arsenspiegel.

Da mir betreffs der Brauchbarkeit dieses Verfahrens Bedenken aufgestiegen waren, so wurden je 180 ccm des Harnes von Periode I nach verschiedenen anderen Methoden behandelt, die ich in der zitierten Arbeit über den Nachweis des Arsens im Harn beschrieben und als „Schmelzverfahren“ resp. „modifizierte A. Neumannsche Methode“ (A. N. M.) bezeichnet habe.

Bei dem ersten Verfahren wird der eingedampfte Harn mit Alkohol ausgezogen, der alkoholische Auszug verdampft, der Rückstand mit Salpetersäure von 1,48 D oxydiert, mit K_2CO_3 neutralisiert, dann mit Salpetermischung geschmolzen, die Schmelze im Kjeldahl-Kolben mit konzentrierter Schwefelsäure erhitzt.[1]) Die so erhaltene verdünnte Lösung kommt in den Marshschen Apparat.

Bei dem zweiten Verfahren wird zunächst ebenso vorgegangen, dann aber die erhaltene salpetersaure Lösung nicht

[1]) Wegen kleiner Modifikationen vgl. die zitierte Arbeit in der Zeitschr. f. physiol. Chem.

neutralisiert und geschmolzen, sondern im Kjeldahl-Kolben mit Schwefelsäure erhitzt unter zeitweisem Zusatz kleiner Mengen Salpetersäure, diese vollständig verjagt; die verdünnte, salpetersäurefreie Lösung kommt in den Marshschen Apparat.

Beide Methoden lieferten bei dem Harn von Periode II ganz enorme Arsenspiegel.

Der Harn der Periode III gab, mit Salzsäure + $KClO_3$ behandelt, schwachen Arsenspiegel, der Harn am 17. (16. zum 17.) nach demselben Verfahren nur eine schwache Spur von Spiegel. Demnach wäre am 5. Tage nach der letzten Dosis die Arsenausscheidung so gut wie abgeschlossen; es wird sich später zeigen, daß dieses tatsächlich nicht der Fall ist.

Man wird fragen, warum ich nicht auch den Harn von Periode II und III nach einem der erfolgreicheren Verfahren bearbeitet habe. Dies liegt daran, daß ich diese erst später an dem mit Chloroform konservierten Harn der Periode I ausgearbeitet habe.

Die Faeces wurden 6 Tage lang nach der Verabreichung von A. P. E. gesammelt, resp. am 14. abgeschlossen und ebenso wie im vorigen Versuch untersucht. Der Niederschlag lieferte keinen Arsenspiegel, das Filtrat einen ziemlich schwachen.

Versuch III.

Kaninchen von 2200 g Körpergewicht, Fütterung mit 600 g Kohl, kein Hafer, erhält von derselben Lösung am 16. und 17./12. 07 je 10 ccm = 0,01 As.

Der Harn vom 16. gab nach dem modifizierten A. Neumannschen Verfahren (A. N. M.) einen enormen Arsenspiegel, ebenso der am 17.

Der Harn vom 18., 19., 20., 21. wurde vereinigt, durch den Wasserzusatz auf 1800 ccm gebracht, mit Chloroform konserviert. 450 ccm (Tagesquantität) gaben nach dem üblichen Verfahren nur einen sehr schwachen Arsenspiegel, nach dem Schmelzverfahren und A. N. M. einen sehr starken, der Harn vom 22. nach A. N. M. einen schwachen Spiegel, ebenso der Harn vom 23., vom 24. sehr schwachen. Der Versuch wurde abgebrochen.

Versuch IV.

Um zu sehen, wie sich die Ausscheidung nach einer einmaligen größeren Dosis gestaltet, gab ich demselben Kaninchen am 28./12. 07 25 ccm einer frisch bereiteten Lösung von derselben Konzentration = 0,0125 As (= 0,0165 As_2O_3).

Es blieb vollständig munter.

Der Harn vom 28. bis 31./12. 07 wurde aufbewahrt, jedoch vorläufig nicht untersucht.

Der Harn der darauffolgenden Tage wurde nach dem modifizierten A. Neumannschen Verfahren untersucht. Das Resultat war folgendes:

Harn vom 2./1., 3./1., 6./1. 08 sehr starker Arsenspiegel,
„ „ 7./1. starker Spiegel,
„ „ 9./1. schwacher Spiegel,
„ „ 10./1. kaum wahrnehmbarer Spiegel.

Man kann danach wohl annehmen, daß die Ausscheidung am 10./1., abgesehen vielleicht von minimalen Spuren, beendet war, das ist 14 Tage nach einer einmaligen Zufuhr von A. P. E.

Versuch V.

Kaninchen von 2050 g Körpergewicht erhielt am 31./12. 07 10 ccm der Lösung = 0,005 As. Der Harn dieses Tages gab nach A. N. M. einen enormen Arsenspiegel. Es erfolgt also schon in derselben 24stündigen Periode eine starke Ausscheidung, somit also schnelle Resorption.

Versuch VI

sollte dazu dienen, festzustellen, wie lange nach einer einmaligen kleineren Dosis die Ausscheidung dauert. — Dasselbe Kaninchen erhielt am 13./3. 08 10 ccm derselben Lösung.

Der Harn der nächstfolgenden Tage wurde nicht untersucht, da über den Arsengehalt kein Zweifel sein konnte.

Der Harn vom 24. und 25. (vereinigt) gab einen deutlichen Arsenspiegel, ebenso der vom 26. und 27. (nicht vereinigt), wenn auch nur schwach; aus dem Harn vom 28. konnte ich keinen Arsenspiegel erhalten. Die letzte Ausscheidung war also nachweisbar am 14. Tage nach der einmaligen Zufuhr, übereinstimmend mit Versuch IV.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß das A. P. E. schnell und in großen Mengen resorbiert wird. In den Darmentleerungen erscheint nur sehr wenig. Allerdings stützt sich diese letztere Angabe auf Versuche, bei denen der Kot in der üblichen Weise mit Salzsäure + $KClO_3$ behandelt wurde. Es ist möglich, daß die beim Harn benutzten Verfahrungsarten größeren Gehalt an Arsen ergeben hätten. Da es sich aber doch nicht entscheiden läßt, ob es sich im Kot um der Resorption entgangenes Arsen handelt oder um auf der Darmschleimhaut ausgeschiedenes, so habe ich geglaubt, mir die Mühe, die Darmentleerungen nach anderen Methoden zu untersuchen, ersparen zu können.

Die Ausscheidung durch den Harn ist schon in der nächsten der Eingabe folgenden 24stündigen Periode stark (Versuch V), zieht sich indessen lange hin.

Nach einer Dosis von 12,5 mg As als A. P. E. dauerte sie 14 Tage (Versuch IV), ebenso lange nach einer einmaligen Verabreichung von 5 mg (Versuch VI). In scheinbarem Widerspruch stehen damit die Ergebnisse aus Versuch I und II.

In Versuch I war die Ausscheidung nach Verabreichung von 15,2 mg As an 3 Tagen am 8. Tage anscheinend fast beendigt, in Versuch II, in welchem 20 mg As in 4 Tagen gegeben wurden, anscheinend schon am 5. Tage nach der letzten Dosis.

Ich zweifle nicht daran, daß diese Differenzen darauf zurückzuführen sind, daß in I und II das übliche Verfahren der Zerstörung der organischen Substanz mit $HCl + KClO_3$ angewendet wurde, allerdings nicht die Fällung durch H_2S, in den Versuchen IV und VI das modifizierte A. Neumannsche Verfahren.

Ich komme nun zu der Frage, in welcher Form das As in dem Harn nach A. P. E.-Darreichung vorhanden ist, ob organisch gebunden oder unorganisch. Diese Frage ist mit Bestimmtheit dahin zu beantworten, daß ein kleiner Teil wohl ionisiert sein kann, die Hauptmenge aber sicher organisch gebunden ist.

Dies geht aus Beobachtungen hervor, die ich an mit arseniger Säure sowie Arsensäure als Na-Salz versetztem, bei Kohlfütterung entleertem Kaninchenharn gemacht habe. Dampft man einen solchen Harn ein und extrahiert mit Alkohol, so

geht das Arsen nicht in den alkoholischen Auszug über, sondern es findet sich in dem Alkoholniederschlag, der nach dem Behandeln mit Salpetersäure und Schwefelsäure einen Arsenspiegel liefert.

Der gut mit Alkohol gewaschene Niederschlag wird, nachdem er an der Luft getrocknet ist, in ein geräumiges Becherglas geschüttet, mit Salpetersäure von 1,2 D übergossen und auf dem Wasserbad erwärmt, bis er sich gelöst hat, die Lösung in den Kjeldahl-Kolben gebracht, etwas rauchende Salpetersäure und 10 ccm Schwefelsäure hinzugesetzt und bis zur völligen Verjagung der Salpetersäure erhitzt. Man findet die arsenige Säure ausschließlich in dem Alkoholniederschlag bei Zusatz von 0,05 bis 0,02 mg As_2O_3 zu der Tagesquantität Kaninchenharn (zirka 450 bis 500 ccm), andererseits auch bei Steigerung der zugesetzten Quantität bis auf 2 mg. Auch in letzterem Falle enthält der Alkoholauszug keine Spur von As, aus dem Alkoholniederschlag wurde ein Arsenspiegel von ca. 1,45 mg erhalten, während derselbe 1,51 mg betragen sollte. Arsensäure dem Harn als Natriumsalz zugesetzt, verhält sich ebenso.

Ganz anders verhält sich der Harn des Kaninchens unter der Einwirkung von verabreichtem A. P. E. Das Arsen geht in diesem Falle in der überwiegenden Hauptmenge in den Alkoholauszug über. Allerdings können sich auch Spuren von As in dem Alkoholniederschlag finden. Dies wurde in zwei Versuchen konstatiert.

Es fragt sich nun, ob die Ausscheidung von Arsen in organischer Bindung dem A. P. E. zukommt oder ob sich nicht auch in dem nach Einführung von As_2O_3 entleerten Harn das As in organischer Bindung befindet, worauf eine schon früher angestellte Beobachtung, die ich weiter unten anführen werde, hinzudeuten scheint.

A. Heffter[1]) berührt diese Frage in einer zusammenfassenden Darstellung über die Ausscheidung körperfremder Substanzen im Harn.

Es heißt daselbst S. 117:

„Husemann hält es für erwiesen, daß es (sc. das Arsen) zum Teil in organischer Bindung ausgeschieden werden kann

[1]) Ergebnisse der Physiologie, I. Abt. Biochemie, II. Jahrg., 1903, 95.

und beruft sich auf eine Beobachtung von Mörner, derzufolge bisweilen durch Einleiten von Schwefelwasserstoff in den angesäuerten Urin von Personen, die Arsen als Arzneimittel gebraucht hatten, kein Niederschlag entstand, während durch andere Proben As mit Leichtigkeit nachgewiesen werden konnte. Dieses Verhalten läßt sich indessen auch ohne Zuhilfenahme einer organischen Arsenverbindung erklären. Arsensäure, an deren Vorkommen im Harn nach den Untersuchungen von Vitali und Bing trotz der gegenteiligen Behauptung Severis nicht gezweifelt werden kann, wird bekanntlich erst durch längeres Einleiten von H_2S bei 70° als Pentasulfid gefällt. Aber außerdem ist zu beachten, daß bei dem Gehalt des Harns an Kolloiden und der Neigung der Arsensulfide, kolloidale Lösungen zu bilden, eine quantitative Abscheidung im Harn, besonders bei kleinen Mengen, nicht stattzufinden braucht."

Das ist unzweifelhaft richtig, dennoch habe ich, wie gesagt, eine Beobachtung gemacht, welche auf das Vorkommen einer organischen Verbindung nach Einführung von As_2O_3 hindeutet. Dieselbe findet sich in meiner öfters erwähnten Arbeit über den Nachweis des Arsens im Harn angeführt. Ein ca. 2300 g schweres, mit Hafer und Kohl ernährtes Kaninchen hatte von einer 0,1 %igen, schwach alkalischen Lösung von As_2O_3 an drei aufeinanderfolgenden Tagen je 10 ccm (+ 15 ccm Wasser) = 0,03 As_2O_3 = 0,0227 As in den Magen erhalten. Der Harn war gesammelt und durch Salzsäurezusatz konserviert.

Aus dem mit Na_2CO_3 alkalisierten, dann eingedampften Harn ging As reichlich in den Alkohol über, was, wie erwähnt, nach Zusatz von Na_3AsO_3 und Na_3AsO_4 nicht der Fall ist. Bei der unbedingten Sicherheit, mit der anorganisches Arsen durch Alkohol aus dem Harn gefällt wird, kann man sich der Schlußfolgerung, daß auch in diesem Falle As organisch gebunden war, nicht entziehen. Das einzige, was man noch einwenden konnte, war allenfalls, daß der Harn längere Zeit (ca. 1 Monat) mit Salzsäure versetzt gestanden hatte, wenn auch nicht abzusehen ist, wie die Salzsäure das Eintreten einer organischen Bindung verursacht haben sollte. Auf alle Fälle schien es mir zweckmäßig, den Versuch zu wiederholen, auch schon aus dem Grunde, weil in dem erwähnten Falle der Alkoholniederschlag überhaupt nicht berücksichtigt war.

Versuch VII.

Kaninchen von 1850 g Körpergewicht erhielt am 18./5. 08 6,6 ccm einer As_2O_3-Lösung von 0,1% = 0,005 As. Das Tier frißt am Versuchstage schlecht, am nächsten Tage schon wieder ganz gut.

Harn vom 18. ca. 300 ccm eingedampft und mit Alkohol ausgezogen. Untersuchung nach A. N. M.:

a) Alkoholauszug: enormer Arsenspiegel.

b) Fällung: Arsenspiegel etwa ebenso stark wie bei a).

Das Arsen ist also in beiden Formen vorhanden.

Harn vom 19. fast 600 ccm; dasselbe Resultat.

Harn vom 20. = 400 ccm:

a) Alkoholauszug: sehr starker Spiegel.

b) Fällung: sehr schwacher Spiegel.

Harn am 21. = 450 ccm: Alkoholauszug; mäßig starker Spiegel.

Harn am 22. = 420 ccm:

a) Alkoholauszug: deutlicher Spiegel.

b) Fällung: Spiegel nicht sicher zu konstatieren.

Harn am 23. = 460 ccm: a + b zusammen; deutlicher Spiegel.

Es ist danach nicht daran zu zweifeln, daß auch nach Einführung von arseniger Säure der Harn organisch gebundenes Arsen enthält; ein Unterschied ist aber doch gegenüber dem arsenparanucleïnsauren Eisen zu konstatieren: während bei diesem allenfalls sehr kleine Mengen ionisiertes Arsen vorhanden waren, war nach Zufuhr von As_2O_3 zunächst etwa ebensoviel resp. etwas mehr ionisiertes Arsen vorhanden, wie organisch gebundenes, später freilich überwog die Ausscheidung in organischer Form bedeutend über die anorganische, zm 5. Tage war letztere nicht mehr zu konstatieren.

Mich interessierte nun weiterhin die Frage, ob die Ausscheidung des Arsens nach Zufuhr von As_2O_3 ebenso lange dauere, wie nach Verabreichung von arsenparanucleïnsaurem Eisen. Es wurden daher die Harne noch eine ganze Reihe von Tagen gesammelt und durch Chloroformzusatz konserviert. Bei der Untersuchung dieser Harne — es wurde direkt der eingedampfte Harn oxydiert — zeigte sich nun die auffallende Erscheinung, daß fortdauernd schwache Arsenspiegel

auftraten, ohne daß eine Abnahme der Stärke des Anfluges zu bemerken war, so auch noch in dem Harn am 4./6., also am 16. Tage nach Einführung von As_2O_3.

So mußte der Verdacht entstehen, daß der Arsengehalt des Harnes gar nicht von dem eingeführten Arsen abhängig sei, sondern aus irgendeiner anderen Quelle stamme.

Als solche Quellen kamen in Betracht: 1. die Reagenzien, 2. das benutzte Filtrierpapier, 3. der zum Auffangen des Harnes dienende, aus Zink bestehende Schiebkasten und endlich 4. die Nahrung selbst. In dem vorliegenden Versuch VII war das Kaninchen mit Kohlrabi (Blätter und Knollen) gefüttert worden, da zur Zeit der Anstellung des Versuchs Weißkohl nicht mehr zu haben war.

1. Zur Prüfung der Reagenzien wurde a) die Schwefelsäure mit dem als arsenfrei bezeichneten Zink für sich geprüft: auch bei stundenlangem Glühen ergab sich keine Spur eines Anfluges von As; b) 20 ccm der angewandten Salpetersäure von 1,48 D mehrere Stunden im Kjeldahl-Kolben mit 10 ccm Schwefelsäure erhitzt; dasselbe Resultat.

2. Filtrierpapier wurde in den folgenden Versuchen ganz vermieden.

3. Der benutzte Käfig wurde gründlich gereinigt und ein soeben vom Händler eingekauftes Kaninchen von 2050 g Körpergewicht hineingesetzt. Der Harn gab einen deutlichen Arsenspiegel, etwa ebenso stark wie in den späteren Tagen des Versuchs VII. Somit stammten die Spuren von Arsen aus dem Zink des Käfigs, trotzdem der Harn immer nur kurze Zeit mit dem Zink in Berührung war. Auffallend war, daß diese Erscheinung in den früheren Versuchen nicht beobachtet war. Vielleicht erklärt sich dies dadurch, daß das Zink des vorher wenig benutzten Käfigs bei dem langen Gebrauch und vielfacher Reinigung stärker angegriffen war, gewissermaßen seine schützende Haut eingebüßt hatte und leichter Zinkoxyd bildete. Möglicherweise hat auch der bei Kohlrabifütterung entleerte stark alkalische Harn eine stärker lösende Wirkung auf Zinkoxyd als der Harn nach Weißkohlfütterung.

4. Es war nun noch die Probe auf das Exempel zu machen. Das Kaninchen wurde in eine große, nach unten trichterförmig endende Glasglocke gesetzt (dieselbe hatte früher zu Respirations-

versuchen gedient); das Tier saß auf einer in die Glocke eingesetzten mit Löchern versehenen Porzellanplatte. Selbstverständlich waren Glasglocke und Porzellanplatte aufs sorgfältigste gereinigt. Nunmehr mußte der Harn arsenfrei sein. Er war es aber nicht! Nach etwa $1^{1}/_{2}$stündigem Glühen war ein ganz geringer, aber doch gegen einen weißen Hintergrund deutlich sichtbarer bräunlicher Anflug wahrnehmbar, viel schwächer freilich als bei dem Auffangen des Harnes im Zinkkäfig, aber doch zweifellos vorhanden. Der Harn wurde an mehreren Tagen untersucht: das Resultat blieb unverändert.

Man muß danach annehmen, daß der verfütterte Kohlrabi Spuren von Arsen enthielt. Ob es sich dabei um einen zufälligen oder regelmäßigen Befund handelt, muß vorläufig dahingestellt bleiben. Bei der großen Verbreitung des Arsens in der Natur und der erwiesenen Fähigkeit der Pflanzen, Arsen aufzunehmen, ist der Befund, wenn er sich bestätigt, im Grunde genommen garnicht so überraschend. Zieht man in Betracht, daß lösliche Arsenverbindungen zweifellos aus verschiedenen gewerblichen Betrieben dauernd, gelegentlich auch wohl aus wissenschaftlichen Laboratorien in die Abwässer gelangen, so wäre namentlich auf den Rieselfeldern Gelegenheit zum Übergang von Spuren Arsen in die Pflanzen vorhanden. Ich brauche kaum hervorzuheben, daß diese minimalsten Spuren in gesundheitlicher Beziehung gänzlich bedeutungslos sind — um so mehr, als die Aufnahme von Gemüse resp. speziell Kohlrabi beim Menschen sich relativ zum Körpergewicht immer in sehr bescheidenen Grenzen hält —, ja vielleicht sogar für die Ernährung von Wert. Beim Nachforschen in der Literatur fand ich nun, daß bereits ältere Angaben über das Vorkommen von Arsen in den Blättern von Brassica oleracea, zu denen der Kohlrabi gehört, und in den Kartoffeln vorliegen. Sie finden sich erwähnt in dem Gmelin-Krautschen Handbuch der anorganischen Chemie 6. Aufl. 2, 2. Abt. S. 545, allerdings mit dem Zusatz „diese Angaben bedürfen der Bestätigung". Der in diesem Zusatz: liegende Zweifel wird jedoch sofort wiederum durch die Bemerkung aufgehoben: „Doch scheint die Möglichkeit einer Aufnahme von Arsen durch die folgenden Beobachtungen[1]) erwiesen." Ob

[1]) Die Anführungen dieser Beobachtungen halte ich hier für entbehrlich.

dieses Vorkommen ein konstantes oder zufälliges ist, muß hier dahingestellt bleiben, es genügt mir, auf die Tatsache hingewiesen zu haben. — Falls jemand die Angabe nachprüfen wollte, würde ich raten, nicht auf die Passage durch den Tierkörper zu verzichten. Diese bietet viel größere Chancen als die direkte Untersuchung. Wir besitzen kein Verfahren, um so große Mengen organischer Substanz, soweit sie in die Reihe der Nährstoffe gehört, mit derselben spielenden Leichtigkeit und ohne Anwendung höherer Temperatur zu zerstören oder doch nahezu vollständig zu zerstören, wie es der Tierkörper vermag. Der Tierkörper ist in dieser Beziehung allen unseren Hilfsmitteln überlegen, die direkte Untersuchung halte ich schon wegen der erforderlichen großen Menge von Chemikalien für gänzlich aussichtslos.

Um das Bild des Verhaltens des arsenparanucleïnsauren Eisens zu vervollständigen, habe ich noch einen Versuch mit subcutaner Einspritzung gemacht.

Versuch VIII.

Kaninchen von 1850 g erhielt von einer Lösung von A. P. E., die in 100 ccm 0,15 As enthielt, am 5./6. 08 2 ccm = 0,003 As subcutan, der Harn vom 5. ergab:

a) Alkoholauszug: sehr starker Arsenspiegel.

b) Niederschlag: ziemlich starker Arsenspiegel.

Die Untersuchung wurde nicht weiter fortgesetzt, da ja schon die durch die einmalige Untersuchung die Resorbierbarkeit vom Unterhautbindegewebe aus festgestellt war.

Ich komme endlich zu der Frage nach dem Verbleib des Arsens in quantitativer Beziehung, die ich nur nebenher und nur an arsenigsaurem Natron untersucht habe.

Alle Autoren stimmen darin überein, daß ein großer Teil des Arsens im Körper verschwindet, nach manchen sogar der größte.

Für dieses Verschwinden sind die verschiedensten Erklärungen aufgestellt, deren Begründet- oder nicht Begründetsein Heffter[1]) einer ausführlichen Untersuchung unterzogen hat.

Danach steht es fest, daß Arsen dauernd in den Epidermoidalgebilden abgelagert wird. Es heißt l. c. S. 408:

---

[1]) Arch. internation. de Pharmacodynamie et de Théraipe 15, 399, 1905.

„Man findet die Haare noch arsenhaltig, wenn nach der Einnahme des Giftes Monate und Jahre verstrichen sind und die Leber und die Knochen bereits arsenfrei gefunden wurden. Der Organismus entledigt sich eines Teils des Giftes durch Ablagerung in die zur Abstossung gelangenden epidermoidalen Gebilde.“

Ebenso bleibt, wenigstens eine Zeitlang, Arsen in der Leber. Über die Art der Bindung in dieser kommt Heffter zu dem Resultat, daß die „Nucleinhypothese“, welche annimmt, daß die Arsensäure die Phosphorsäure im Nuclein ersetze, sich nicht als ausreichend begründet nachweisen läßt, die „Lecithinhypothese“ sicher unbegründet ist.

Wenn nun auch durch diese Beobachtungen die Ansicht von dem spurlosen Verschwinden eines großen Teils des Arsens noch einer einmaligen oder einigen Gaben als unbegründet erwiesen ist, so bleibt es doch fraglich, ob durch den Übergang in die Epidermoidalgebilde der Verbleib des Arsens in quantitativer Richtung vollständig aufgeklärt ist, und es bleibt auffallend, daß von einer so leicht löslichen Substanz, wie das arsenigsaure Natron, bei Zuführung per os nur so geringfügige Mengen in den Harn übergehen, wie die meisten Autoren angeben; nach Heffter beim Hund 18 bis 19°/₀, beim Menschen 8 bis 14°/₀. Die enormen Arsenspiegel, die ich in meinen Versuchen öfters erhielt, bestärkten mich in dem nach meinen sonstigen Beobachtungen schon bestehenden Verdacht, daß die Geringfügigkeit der Ausscheidung vielleicht nur eine scheinbare sein möchte, verursacht durch die allgemein übliche Methode des Nachweises. Möglicherweise könnte sich ja aber auch das Kaninchen anders verhalten wie der Hund und der Mensch.

Leider habe ich es in den früheren Versuchen versäumt, die quantitative Ausscheidung zu berücksichtigen und dies nur in Versuch VII getan, der sich auf das Verhalten der arsenigen Säure bezieht. Wie Armand Gautier, Hödlmoser[1]), Polenske[2]), Heffter bediente auch ich mich der Wägung des Arsenspiegels.

Man schneidet den den Arsenspiegel enthaltenden Teil der

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 329, 1901; daselbst die Literaturangaben betreffs Gautier.

[2]) Jahresb. f. Pharm. über das Jahr 1889 (H. Beckurts), 1891, 196.

Röhre heraus, wägt ihn, befreit ihn von Arsen und wägt aufs neue. Es läßt sich ja mancherlei gegen dieses Verfahren sagen. Vor allem setzt es eine ganz besonders feine Wage voraus. Wenn die Wage, wie die mir zur Verfügung stehende, nur $^1/_{10}$, höchstens $^1/_{20}$ mg angibt, so können die Resultate, bei Arsenmengen von einigen Zehntel Milligramm, um die es sich hier handelt, nur annähernde sein. Man muß ferner sorgfältig auf etwaige beim Herausschneiden der Röhre entstehende Risse achten, die bei der Behandlung der Röhre zur Entfernung des Arsens zu Absplitterungen von Glas und damit zu Fehlern führen können. Immerhin zeigen die von Hödlmoser und Heffter mitgeteilten Kontrollversuche, daß sich mit den Verfahren arbeiten läßt.

Die Entfernung des Arsens bewirkt Polenske durch Erwärmen mit Salpetersäure, Abspülen und Trocknen. Ich habe dieses in einigen hier nicht mitgeteilten Versuchen auch getan — die Röhre wurde noch mit Alhohol und Äther gewaschen —, finde aber die Entfernung durch einfaches gelindes Erwärmen bequemer. Zweckmäßig streift man dabei das Röhrenstückchen auf eine der zu bakteriologischen Zwecken üblichen Platin-Impfnadel (die natürlich keine Öse am Ende trägt) und erhitzt gelind direkt über der Flamme.

In dem Versuch VII ergaben sich nun so folgende Gewichte für den Arsenspiegel:

Harn vom 18. a)[1]) 0,5 mg b) 0,7 = 1,2 mg,
„ „ 19. a) 0,8 „ b) 0,3 = 1,1 „
„ „ 20. a) 0,4 „ b) nicht wägbar = 0,4 mg,
„ „ 21. a) 0,2 „ b) nicht bestimmt = 0,2 „
„ „ 22. a) etwas mehr als 0,1 mg,
„ „ 23. a) + b) zusammen bestimmt etwas mehr als 0,1 mg.

Das ergibt zusammen 3,1 mg As = 62 $^0/_0$ des angewendeten. Dieser Wert ist indessen als Minimalwert anzusehen. Zunächst ist das Verfahren in quantitativer Beziehung im Prinzip nicht ganz einwandfrei, da aus Lösungen von Arsensäure beim Erhitzen mit Salzsäure Arsen entweicht.[2]) Dies muß natürlich

---

[1]) a) = Alkoholauszug, b) = Alkoholniederschlag.

[2]) Mayrhofer Annal. d. Chem. u. Pharm. 158, 316, 1871.

auch im vorliegenden Falle geschehen, wenn die kochsalzhaltigen oxydierten Harnextrakte mit Schwefelsäure erhitzt werden.[1]) Ebensowenig war die Ausführung der Untersuchung eine quantitativen Anforderungen entsprechende, namentlich wurde die salpetersaure Lösung des Harnrückstandes nicht quantitativ genau in den Kjeldahl-Kolben übergeführt: ich hatte ja ursprünglich quantitative Bestimmungen gar nicht beabsichtigt, bin vielmehr erst durch die erwähnte Arbeit von Heffter in dem Arch. de Pharmacodynamie usw. hierzu angeregt worden. Die Spiegel waren z. T. auch schon vor einiger Zeit hergestellt.

Zieht man nun in Betracht, daß die Ausscheidung, wenn auch in geringer Menge, noch einige Tage fortdauerte, daß der Kot nicht berücksichtigt ist, daß ein gewisser Teil des Arsens in die Epidermoidalgebilde übergeht, so liegt meiner Ansicht nach kein Grund mehr zu der Annahme vor, daß die arsenige Säure bezüglich ihres Verhaltens im Organismus eine Ausnahmsstellung einnimmt. Auch die Langsamkeit der Ausscheidung kann man nicht für eine solche geltend machen. Sie erklärt sich durch die vorübergehende Bindung in der Leber und in den Knochen. Außerdem kennen wir ja zahlreiche, selbst sehr leicht lösliche Substanzen, deren Ausscheidung sich sehr lange hinzieht, als das hervorragendste Beispiel nenne ich nur das Rhodankalium. Bezüglich der Unvollständigkeit der Ausscheidung erinnere ich daran, daß noch nie alles Jod nach Einnahme von Jodkalium wiedergefunden wurde.

Ob das Kaninchen bezüglich der Ausscheidung des Arsens eine Sonderstellung einnimmt, was wenig wahrscheinlich, oder ob auch beim Hund und Menschen die Ausscheidung bei Anwendung guter Methoden ähnliche Werte erreicht, muß ich dahingestellt sein lassen.

Ganz kurz sei noch die Frage der Giftigkeit des Arsens im arsenparanucleinsauren Eisen berührt.

Nachdem ich gefunden hatte, daß bei Kaninchen von ca. 2 kg Körpergewicht

15,2 mg As = 20,1 mg As_2O_3 in 3 Tagen (Versuch I),
20 „ „ = 26,4 „ „ „ 4 „ („ II),

[1]) In dem einen obenerwähnten Kontrollversuch ist dieses allerdings höchstens in sehr geringem Grade der Fall gewesen.

10 mg As = 13,2 mg As_2O_3 in 2 Tagen (Versuch III),
12,5 „ „ = 16,5 „ „ „ 1 Tage („ IV)

keine Wirkung gezeigt hatten (nur in Versuch II war eine leichte Abnahme der Freßlust zu konstatieren), glaubte ich, daß die Verbindung wesentlich weniger giftig sei als die arsenige Säure. Ein bereits in der zitierten Arbeit in der Zeitschr. f. physiol. Chem. berichteter Versuch zeigte indessen, daß die Toleranz am Kaninchen gegen arsenige Säure weit größer ist, als ich angenommen hatte. In diesem Versuch erhielt ein Kaninchen von 2 kg Körpergewicht je 0,01 As_2O_3 in schwach alkalischer Lösung an drei aufeinanderfolgenden Tagen, im ganzen also 30 mg As_2O_3 = 22,7 mg As in 3 Tagen. Das Tier blieb vollständig gesund, der Harn enthielt reichlich Arsen. Demnach liegt kein Grund vor, dem As in dem arsenparanucleïnsauren Eisen eine geringere Wirkung zuzuschreiben als in der arsenigen Säure.

Zum Schluß möchte ich die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung kurz zusammenfassen:

1. Mit Hilfe der Alkolfällung läßt sich im alkalischen Kaninchenharn organisch gebundenes Arsen und anorganisches leicht unterscheiden. Man findet dem Harn zugesetztes Natriumsalz der arsenigen und Arsensäure ausschließlich im Alkoholniederschlag. Dies gilt sowohl für $^1/_{20}$ mg As_2O_3, als auch für 2 mg auf die Tagesquantität (400 bis 500 ccm) Harn.

2. Das arsenparanucleïnsaure Eisen wird vom Darmkanal aus schnell resorbiert, der Harn enthält reichlich Arsen. Dieses Ergebnis verstärkt die schon früher ausgesprochene Ansicht, daß das arsenparanucleïnsaure Eisen in der Tat eine chemische Verbindung ist, denn arsensaures Eisen wird nach der allgemeinen Anschauung nicht resorbiert.

3. Der Harn enthält nach Einführung der genannten Verbindung das Arsen fast ausschließlich in organischer Bindung, an den ersten Tagen kann auch etwas anorganisches Arsen vorhanden sein.

4. Ebensogut wie vom Darmkanal wird das arsenparanucleïnsaure Eisen auch vom Unterhautbindegewebe resorbiert.

5. Nach Verabreichung von arseniger Säure enthält der Harn sowohl organisch gebundenes, als anorganisches Arsen,

das erstere etwas überwiegend; das anorganische Arsen tritt im späteren Verlauf sehr zurück.

6. Von Kaninchen innerlich beigebrachtem, arsenigsaurem Natron wurden in den ersten 6 Tagen mindestens 62°/₀ durch den Harn wieder ausgeschieden. Abgesehen von der von anderer Seite festgestellten Ablagerung von Arsen in den Epidermoidalgebilden liegt kein Grund vor, dem Natriumarsenit eine Ausnahmestellung gegenüber anderen, leicht löslichen Körpern zuzuschreiben.

7. Es scheint, daß manche Vegetabilien äußerste Spuren von Arsen enthalten.

Zur Wertbestimmung der Katalasen und Oxydasen im Blut.

Erste Mitteilung.

Von

Walther Löb.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Rudolf Virchow-Krankenhauses in Berlin.)

(Eingegangen am 24. August 1908.)

Mit 2 Figuren im Text.

Einleitung und Untersuchungsmethoden.

Die von Schönbein beobachtete Tatsache der Wasserstoffperoxydzersetzung durch Blut ermöglicht im Verein mit der Guajacreaktion eine Unterscheidung der Katalasen und Oxydasen, die u. a. zu der Auffindung und Untersuchung der Hämase durch Senter[1]) führte. Die Vermutung, daß die beiden Enzymarten im Blute mit Oxydationsvorgängen in nahem Zusammenhang stehen, ist häufig geäußert worden. Der Aufklärung dieser Verhältnisse steht vorläufig die große experimentelle Schwierigkeit der Reindarstellung der Enzyme entgegen, so daß die bisherigen Ergebnisse eine Reihe noch unbekannter Faktoren enthalten. Zweifellos gehören aber Katalasen und Oxydasen zu den charakteristischen Elementen des Blutes, deren Beziehungen zu den Zuständen des Organismus so innige sind, daß die Aussicht besteht, wenn auch nicht durch die Feststellung ihrer Menge, so doch durch die Messung ihrer Wirksamkeit Aufschlüsse zu erhalten, die für die Zustandsbeurteilung des Gesamtorganismus von Bedeutung sein können.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 44, 257, 1903; 51, 673, 1905.

Quantitative Versuche dieser Art sind u. a. von Jolles[1]) und Lesser[2]) angestellt worden, welche die Schönbeinsche Reaktion als Maß für die Wirkung und relative Menge der Katalasen im Blut benutzten.

Jolles entnahm dem Ohrläppchen oder der Fingerbeere 0,05 ccm Blut und blies es in ein 50 ccm-Kölbchen, das 30 ccm physiologische Kochsalzlösung enthielt, spülte mit der gleichen Lösung die Pipette nach und füllte mit derselben auf 50 ccm auf. Von dieser Flüssigkeit setzte er 10 ccm (0,01 ccm Blut) zu 30 ccm einer 1 % neutralen Wasserstoffperoxydlösung, ließ zwei Stunden bei 15° stehen und bestimmte nach dieser Zeit den Gehalt an Wasserstoffperoxyd. Die Anzahl Gramme, die 1 ccm Blut in der angegebenen Zeit zersetzt, wird als Katalasenzahl bezeichnet. Sie liegt bei normalem Blut zwischen 18 und 30, meist zwischen 20 und 26. Arterielles und venöses Blut zeigen keine Differenzen, pathologische Fälle meist eine Herabsetzung der Katalasenzahl.

Eine ähnliche Methode befolgte Lesser. Er fand, daß die Blutarten verschiedener Tiere sich hinsichtlich der Intensität der Katalasenwirkung sehr verschieden verhalten. Auch der Guajacreaktion schenkte Lesser Aufmerksamkeit, freilich nur in qualitativer Richtung. Er konnte die durch Blut und Wasserstoffperoxyd veranlaßte Blaufärbung durch Zusatz verschiedener, reduzierend wirkender Stoffe aufheben, aber auch nachweisen, daß bei der Zerlegung des Wasserstoffperoxyds durch Katalase weder Fett noch Traubenzucker oxydiert werden.

Bei der Einfachheit der Schönbeinschen Reaktion scheint ihre wissenschaftliche und praktisch-diagnostische Ausnutzung noch recht geringfügig. Durch die Arbeiten Ostwalds, Bredigs, Senters, Eulers u. a. ist die Kinetik katalytischer Reaktionen, der sich jene Enzymreaktion unterordnet, auf eine genügend sichere Basis gebracht, um den katalytischen Vorgang

$$H_2O_2 \rightarrow H_2O + O,$$

mag der Sauerstoff aktiv oder inaktiv abgespalten werden, zum Ausgangspunkt weiterer Versuche zu wählen. Da die

[1]) Münch. med. Wochenschr. 1904, 2083; Fortschritte der Medizin. 22, 1229, 1904; Virchows Archiv 180, 185, 1905; Zeitschr. f. anal. Chem. 44, 1.

[2]) Zeitschr. f. Biol. 48, 1, 1906.

durch die Oxydase veranlaßte Oxydation, wie sie sich durch Bläuung einer Guajac- oder Benzidinlösung offenbart, zweifellos gleichfalls einen katalytisch beschleunigten Prozeß darstellt, so erscheint die quantitative Verfolgung auch dieses Vorgangs angebracht.

Man kann die Messung der Enzymwirkungen auf Wasserstoffperoxyd in zweierlei Weise vornehmen. Entweder beobachtet man den Reaktionsverlauf mit der Zeit, wie es Senter bei der Hämase getan hat, und vergleicht die Zeitumsatzkurven, die bei der anfänglichen Proportionalität der Katalysatormenge mit der Umsatzmenge einen Schluß auf den relativen Enzymgehalt gestatten. Oder man führt die Versuche bis zu einem Gleichgewicht durch und prüft, ob eine Verschiebung desselben in Abhängigkeit von der Enzymmenge zu konstatieren ist. Selbstverständlich kann es sich in dem letzteren Falle nur um ein scheinbares Gleichgewicht handeln, das durch die Gegenwirkung der Reaktionsprodukte gegen den durch das Enzym veranlaßten Verlauf erzielbar ist. Es erscheint daher sehr wohl möglich, daß dieses scheinbare Gleichgewicht durch die Enzymmenge reguliert wird. Es ist für das Eintreten des scheinbaren Gleichgewichtes nicht erforderlich, daß die H_2O_2-Zersetzung eine reversible Reaktion ist. Herlitzka[1]) hat bei einer Katalase aus Ochsenleber keine Abhängigkeit des Spaltungsgrades bei Veränderung des partialen Sauerstoffdruckes, also keine Reversibilität feststellen können. Wie die Versuche ergaben, ist die Erreichung eines scheinbaren Gleichgewichtes möglich, d. h. die Zersetzung des H_2O_2 kommt vor seinem völligen Verbrauch zum Stillstand und kann durch erneuten Zusatz des Enzyms wieder angeregt werden.

Als Maß der Spaltung des Wasserstoffperoxyds wurde an Stelle der genaueren titrimetrischen Methoden die Sauerstoffbildung selbst gewählt, und zwar aus verschiedenen Gründen. Erstens kam es darauf an, eine direkte und bequeme Ablesung zu erhalten, um für den Fall ihrer Brauchbarkeit die Methode in einer für den Arzt praktischen Ausführungsform zu besitzen. Dann aber mußte, um ein falsches Gleichgewicht zu erreichen,

---

[1]) Rendic. d. R. Ac. d. Lincei 15, (5), II. Sem. (nach Malys Tierchemie.)

der Sauerstoff im System gehalten, in gegen die Luft abgeschlossenen Gefäßen mithin gearbeitet werden. Schließlich war beabsichtigt, auch die Oxydasenwirkung zu messen. Es wurde hierbei die Annahme zugrunde gelegt, daß auch die Oxydasen Wasserstoffperoxyd zerlegen, daß also der Gesamtsauerstoff, der aus reinem H_2O_2 zur Ausscheidung gelangt, durch Katalasen und Oxydasen geliefert ist, d. h. ein Gemenge von aktivem und inaktivem Sauerstoff darstellt. Gelingt es, durch einen geeigneten Depolarisator, einen oxydabeln Körper, den aktiven Sauerstoff zu binden, so ließe sich aus der Differenz in den Sauerstoffbestimmungen mit und ohne Depolarisator ein Schluß auf den relativen Oxydasen- und Katalasenwert ziehen. Zweifellos besitzt ein solches Verfahren bei unserer Unkenntnis über die an der H_2O_2-Katalyse beteiligten Enzyme des Blutes große Unsicherheit, wenn man aus den erhältlichen Werten einen Schluß auf die wirkliche Menge irgendwie genauer charakterisierter Enzyme ziehen wollte. Aber weder war das letztere das Ziel der Untersuchung, noch ist seine Erreichung bei dem jetzigen Stande unseres Wissens überhaupt möglich. Es handelt sich vielmehr darum, experimentell möglichst genau definierte Verhältnisse zu wählen und die experimentellen Ergebnisse mit anderen beobachteten Tatsachen in einen Zusammenhang zu bringen. Eine Spezialisierung der Enzyme wurde nicht angestrebt, so daß der Wahl der Bezeichnungen und der Deutungen notgedrungen noch ein hohes Maß von Willkür anhaftet.

Gegen die Durchführbarkeit des Untersuchungsplanes sprachen mehrere Angaben der Literatur. Schon Liebermann[1]) hat versucht, die entwickelte Sauerstoffmenge direkt zu messen, eine Methode, die, worauf schon Senter[2]) aufmerksam machte, die Gefahr fehlerhafter Ablesungen durch Übersättigungserscheinungen einschließt. Aber die Gefahr eines größeren Fehlers besteht nur für den Fall einer sehr geringen Sauerstoffentwicklung, wie sie Liebermann beobachtete. Durch Wahl geeigneter Verhältnisse ist es ein leichtes, die Sauerstoffmenge so zu vergrößern, daß der Übersättigungsfehler belanglos wird.

Ferner hat Liebermann bei seinen Studien über die

---

[1]) Pflügers Archiv 104, 176, 1904.

[2]) loc. cit.

Katalyse der Wasserstoffperoxydzersetzung durch kolloidales Platin und die Fermente des Malzauszuges beobachtet, daß die Sauerstoffentwicklung in Gegenwart von Guajactinktur und Indigo zurückgeht, und den Schluß gezogen, daß der Sauerstoff zur Oxydation verbraucht wird. Eine ähnliche Anschauung vertritt Lesser. Hiergegen erhebt Senter Einwände auf Grund seiner Beobachtung, daß Indigolösung auch bei kräftiger Wasserstoffperoxydzersetzung nicht entfärbt wird, und bemerkt, daß vielleicht eine besondere Oxydase im Malzauszug tätig ist. Diese Möglichkeit ist ohne weiteres zuzugeben; die ganze Definition der Katalasen und Oxydasen ist in letzter Linie auf die mehr oder weniger starke Aktivität des abgespaltenen Sauerstoffes gegründet.

Der Begriff der Aktivität des Sauerstoffs ist natürlich auch nur ein relativer und richtet sich nach der mehr oder weniger leichten Oxydierbarkeit des gerade vorliegenden Depolarisators. Auch der durch Katalasen entwickelte Sauerstoff ist aktiv gegenüber solchen Substanzen, die bereits vom Luftsauerstoff oxydiert werden. Allgemein muß man sagen, daß jedes Enzym aus dem Wasserstoffperoxyd den Sauerstoff mit einem bestimmten Oxydationspotential entwickelt und daher die Übertragung dieses Sauerstoffs auf jeden Depolarisator, der auf das gegebene Depolarisationspotential anspricht, anzuregen vermag. Die Begriffe der Oxydasen und Katalasen können daher ineinander übergehen, wenn man sie nicht durch den Depolarisator für den entwickelten Sauerstoff abgrenzt. Wählt man die Oxydation einer Guajaclösung durch H_2O_2 als Kennzeichen für die Gegenwart einer Oxydase, so findet man im Blute Katalase und Oxydase, wählt man aber Traubenzucker, der nicht nachweisbar oxydiert wird, so fehlt die Oxydase, und nimmt man einen durch Luftsauerstoff oxydablen Körper, so findet man nur Oxydasen. Hier können erst durch die Messung der Oxydationspotentiale des abgespaltenen Sauerstoffs durchsichtige Verhältnisse geschaffen werden. Wenn daher Senter bei seinen Blutuntersuchungen feststellt, daß die Eigenschaft des Blutes, Wasserstoffperoxyd zu zersetzen, nicht in Zusammenhang mit seiner Eigenschaft, Guajactinktur zu bläuen, steht, so kann aus dieser Feststellung ein allgemeiner Schluß nicht gezogen werden. In den Versuchen wird gezeigt werden, daß

das Vermögen der Peroxydzersetzung in engem Zusammenhang mit bestimmten Oxydationswirkungen steht und daß bei Gegenwart von z. B. Benzidin, Pyrogallol, Salicylaldehyd ein bestimmter Teil des Sauerstoffs zu Oxydationswirkungen zurückgehalten wird. Es ist also möglich, die Katalasen- und Oxydasenwirkung in bezug auf einen bestimmten Depolarisator quantitativ zu trennen. Mehr als eine solche, nur empirisch begründete Ordnung der Enzymwirkungen im Blut konnte zunächst nicht erstrebt werden.

Außer der Volummessung des entwickelten Sauerstoffs wurde eine Methode, seinen Druck direkt abzulesen, konstruiert und dieser schließlich wegen der größeren Bequemlichkeit und Handlichkeit der Vorzug gegeben.

Alle bisher angestellten Versuche, deren Mitteilung in der nächsten Zeit erfolgen soll, sind in Gemeinschaft mit Herrn Dr. Mulzer durchgeführt.

Leider konnten wir durch äußere Umstände die gemeinsame Arbeit nicht in der beabsichtigten Weise durchführen. Wir halten es aber trotzdem für richtig, die nicht abgeschlossenen Ergebnisse zu veröffentlichen, weil die große Anzahl der sich aufdrängenden Fragen weitere Kreise zur Mitarbeit erfordert und die Kompliziertheit des Problems seine Inanspruchnahme von den verschiedensten Seiten wünschenswert macht.

Über folgende Punkte haben wir Versuche ausgeführt:

1. Einfluß der H_2O_2-Konzentration.
2. Einfluß der Blut-Konzentration.
3. Einfluß des Zusatzes von Sauerstoffdepolarisatoren.
4. Zusammenhang zwischen Wirkungswert des Blutes und seinem Hämoglobingehalt bzw. seiner Erythrocytenzahl.

Bei den Versuchen werden alle Einzelheiten, wie Temperaturen usw., angegeben; hier möge nur noch die Beschreibung der benutzten Apparate folgen. Die Methode zur Messung des Sauerstoffvolums sei als „Volummethode", die zur Messung des Drucks als „Druckmethode" bezeichnet.

Volummethode.

Die Einrichtung und die Größe des Apparates geht aus der nebenstehenden Zeichnung (Fig. 1) hervor.

Das Zersetzungsgefäß *A* besteht aus einem starkwandigen

Glasgefäß, das sich zu einem langen, rechtwinklig gebogenen Glasrohr verjüngt. Dasselbe ist eng gewählt, um die Diffusion des Sauerstoffs von der Flüssigkeitsoberfläche möglichst hintan zuhalten. An das Glasrohr schließt sich, durch Gummischlauch verbunden, das der Hempelschen Bürette nachgebildete Meßrohr *E* mit Niveaurohr *G*. Die graduierte Bürette hat oberhalb des Nullpunktes ihrer Teilung einen Schliffhahn *F*. Unter-

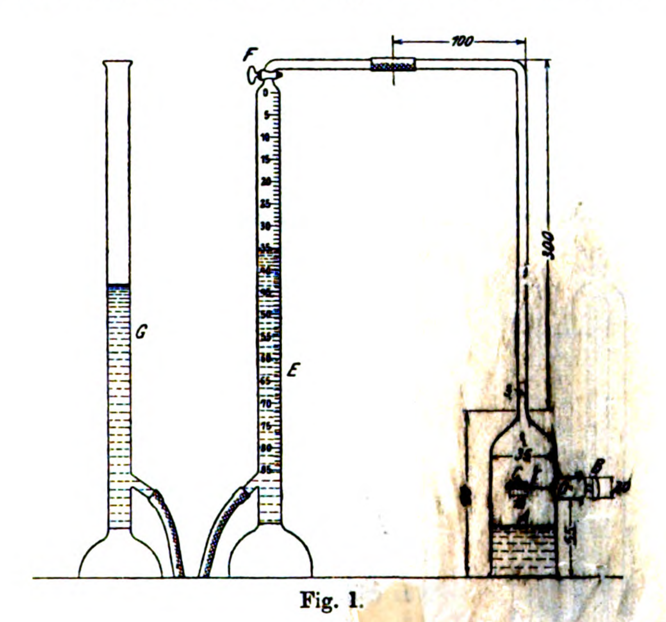


Fig. 1.

halb der Verjüngung zum Glasrohr trägt das Zersetzungsgefäß *A* ein etwa 2 cm weites Ansatzstück, in das der hohle Glasstöpsel *B* eingeschliffen ist. *B* besitzt im Schliff eine kleine Öffnung *D*, der eine ebensolche in dem Ansatzstück enspricht, so daß durch Drehung von *B* die Kommunikation mit der Außenluft hergestellt oder verhindert werden kann. An den Schliffhahn *B* ist mittels eines kurzen Glasstabes der Teller *T*, eine kreisrunde Scheibe, angebracht, die an der Peripherie drei kleine vertikale Erhöhungen trägt, um das Hinabgleiten des kleinen etwa 4 mm hohen Schälchens *C* zu verhindern.

Die Benutzung des Apparates ist die folgende: Nach Entfernung des Stöpsels *B* werden 25 ccm der H_2O_2-Lösung in *A* und das entsprechend verdünnte Blut in abgemessener Menge

mittels Pipette in das Schälchen *C* gebracht, dieses auf den Teller des gut eingefetteten Stöpsels *B* gesetzt und letzterer bei horizontaler Stellung des Tellers in den Schliffansatz geschoben. Durch eine leichte Drehung, bei der ein Abstürzen des mit Blut gefüllten Schälchens ausgeschlossen ist, stellt man die Kommunikation mit der Luft her, bringt den Apparat in den Thermostat, so daß *A* vollständig vom Thermostatenwasser bedeckt ist, und wartet den Temperaturausgleich ab. Sodann wird die Bürette *E* mit dem Apparat verbunden, nach Öffnung von *F* auf Null eingestellt und nach Abschluß der Luft durch Drehung von *B* die Konstanz der Einstellung kontrolliert. Ist diese erreicht, so läßt man durch eine Drehung an *B* von 180° das Schälchen *C* in die Peroxydlösung fallen, schüttelt einmal tüchtig um und beobachtet nun in bestimmten Zeitintervallen die durch die Sauerstoffentwicklung verdrängte Luftmenge bei Atmosphärendruck unter Beobachtung der Ablesetemperatur (Temperatur des Bürettenwassers) und des Barometerstandes.

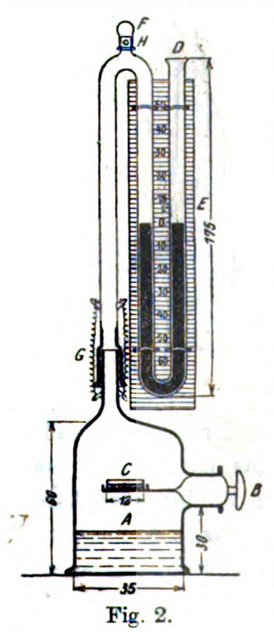


Fig. 2.

Druckmethode.

Das Zersetzungsgefäß *A* (Fig. 2) und die Fallvorrichtung sind die gleichen wie die in der Volummethode angewandten. Nur wählt man bei den immerhin erheblichen Sauerstoffdrucken, die auftreten können, den Stöpsel *B* massiv und bringt die Anordnung zur Her- bzw. Abstellung der Luftkommunikation am Manometer in Form des aufgeschliffenen, mit Öffnung *H* versehenen Helmes *F* am Manometer *D* an. Das letztere wird mit Quecksilber gefüllt, dessen Stellung auf einer in Millimeter geteilten Skala *E* ablesbar ist. Zur bequemeren Reinigung des Apparates ist das Manometer abnehmbar und endet in dem übergreifenden, aufgeschliffenen Ansatz *G*, der durch zweckmäßige Befestigung mit *A* gesichert wird. Alle Schliffstellen müssen gut eingefettet sein. Die Belastung des Apparates ist so verteilt, daß er auch ohne Beschwerung oder Einfassung

von *A* feststeht. Die Füllung geschieht in der oben geschilderten Weise. Während des Temperaturausgleichs im Thermostaten bleibt durch *F* die Verbindung mit der Außenluft bestehen, so daß das Quecksilber in beiden Manometerschenkeln auf Null steht. Nach Abschluß der Öffnung *H* überzeugt man sich von der Konstanz der Quecksilberstellung, bringt durch Drehung von *B* das Blut in die Peroxydlösung und beobachtet nach einmaligem Schütteln die Druckzunahme mit der Zeit bzw. bis zu einem Endzustand.

Der Lecithingehalt der Milch.

Von

J. Nerking und E. Haensel.

(Aus der biochemischen Abteilung des Instituts für experimentelle Therapie zu Düsseldorf.)

(Eingegangen am 1. September 1908.)

Als erster erwähnte das Vorkommen des Lecithins in der Milch, jedoch ohne Angabe der ungefähren Menge, Tomatscheff[1]). Stoklasa[2]) bestimmte dann quantitativ den Gehalt an Lecithin nach einer allerdings nicht ganz einwandfreien Methode. Schmidt-Mühlheim[3]) gibt für Kuhmilch einen Gehalt von 0,004 %, für Butter einen solchen von 0,15 bis 0,17 % Lecithin an, während Burow[4]) für Kuhmilch 0,049 bis 0,058 %, für Hundemilch 0,06 bis 0,18 % und für Frauenmilch 0,058 % feststellte. Ähnliche Werte wie Burow erhielten Bordas und de Raczkowski[5]). Neuerdings kam dann Schloßmann[6]) auf Grund seiner Untersuchungen zu der Ansicht, daß in der Milch kein Lecithin vorhanden und dort, wo es gefunden sei, die Möglichkeit vorläge, daß phosphorhaltige Zersetzungsprodukte des Caseins in die Ätherlösung übergegangen seien und Lecithin vorgetäuscht hätten. Gegen diese Auffassung wendet sich W. Koch[7]), der die negativen Resultate Schloßmanns damit zu erklären sucht, daß Schloßmann versucht hatte, das

---

1) Hoppe-Seylers med. chem. Untersuchungen 2, 272, 1867.
2) Zeitschr. f. physiol. Chem. 23, 343, 1897.
3) Arch. f. d. ges. Physiol. 30.
4) Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, 495.
5) Arch. f. Kinderheilk. 40, 18, 1905.
6) Zeitschr. f. physiol. Chem. 47, 327.
7) Journ. of biolog. Chem. 1, 203, 1905.

Lecithin quantitativ aus der Milch mit Äther auszuschütteln, was des hohen Wassergehaltes der Milch wegen unmöglich wäre, da nach den Untersuchungen Thudichums es sogar beinahe unmöglich ist, aus dem lecithinreichen Hirn das Lecithin mit Äther auszuschütteln, bevor nicht das Wasser entfernt ist. Koch führt die Analysen Woods an, der nach einer besonderen Methode Lecithin und Kephalin in der Milch nachwies und bestimmte. Die Methode Woods bestand kurz in folgendem: 100 ccm Milch werden $^1/_2$ Stunde gekocht mit 200 ccm Alkohol, dann wird filtriert, der Niederschlag noch zweimal mit Alkohol ausgezogen, die vereinigten alkoholischen Filtrate bei 60° C verdunstet, der Rückstand mit heißem Äther ausgezogen; die Ätherlösung wird verdunstet, der ätherische Rückstand mit etwa 50 ccm Wasser emulgiert und mit chloroformhaltiger 0,5%iger Salzsäure gefällt. Diese Fällung wird abfiltriert, in Alkohol gelöst, aus dieser Lösung das Kephalin mit ammoniakalischer Bleiacetatlösung entfernt und im Filtrat das Lecithin aus dem Phosphorgehalt bestimmt; aus dem Gehalt an Phosphor im Niederschlag kann das Kephalin berechnet werden. Woods fand nach dieser Methode folgende Werte:

	Lecithin %	Kephalin %	Insgesamt %
Frauenmilch	0,041	0,037	0,078
Kuhmilch	0,049	0,037	0,086
	0,036	0,045	0,081
	0,045	0,027	0,072

Das Kochen der Milch mit Alkohol bei dieser Methode ist für das Lecithin sicher nicht gleichgültig, schon Bordas und de Raczkowski machen auf die leichte Zersetzlichkeit des Lecithins beim Kochen der Milch aufmerksam. Raudnitz[1]) gibt für Milch einen Gehalt von 0,06 g Lecithin im Liter an und spricht die Vermutung aus, daß das Lecithin vielleicht gebunden an Eiweiß als Lecithalbumin vorhanden sei, ohne allerdings einen Beweis für diese Hypothese zu erbringen; übrigens sind nach Raudnitz auch die von mehreren Autoren

[1]) Raudnitz in Schloßmann u. Pfaundlers Lehrbuch der Kinderheilkunde.

in der Milch beschriebenen Nucleone Kunstprodukte gewesen. Burow zog aus seinen Untersuchungen den Schluß, daß der Gehalt der Milch an Lecithin abhängig sei vom Gehalt derselben an stickstoffhaltiger Substanz und in einem bestimmten Verhältnis stehe zum Hirngewicht des Säuglings, dergestalt, daß einem höheren relativen Hirngewicht auch ein größerer prozentisch auf Stickstoffsubstanz berechneter Lecithingehalt der Milch entspräche. Die Methode Burows, der zuerst nach der von Stoklasa gegebenen Vorschrift zur Bestimmung des Lecithins arbeitete, aber nachwies, daß diese zu hohe Werte für den Phosphorgehalt gab, bestand in folgendem: es wurden 100 ccm Milch tropfenweise in eine Mischung von 100 ccm Alkohol + 100 ccm Äther mit 5 Tropfen 30%iger Essigsäure unter fortwährendem Umschütteln eingetragen und 24 Stunden verschlossen stehen gelassen; dann wurde von dem Niederschlag abfiltriert, der Rückstand sorgfältig mit Ätheralkohol ausgewaschen und die so erhaltenen Filtrate bei 50° C im Thermostaten zum zähen Sirup konzentriert; diese Masse wurde mit reinem wasserfreiem Äther wiederholt ausgelaugt, der hierbei bleibende geringe Rückstand erwies sich ebenso wie die ursprüngliche durch Ätheralkohol erhaltene Fällung bei der Analyse als absolut phosphorfrei. Die Ätherauszüge wurden in der Platinschale zur Trockne verdampft, der Trockenrückstand mit Sodasalpetermischung verascht und in der Asche die Phosphorsäure als pyrophosphorsaure Magnesia bestimmt. Durch Multiplikation der erhaltenen $Mg_2P_2O_7$ mit 7,27 berechnet man das Lecithin.

Wir verzichteten darauf, nach dem Vorgang Woods eine getrennte Bestimmung von Lecithin und Kephalin vorzunehmen, weil es uns darauf ankam, überhaupt das Vorkommen von Phosphatiden in der Milch nachzuweisen.

Zur Bestimmung des Lecithins in der Milch verfuhren wir folgendermaßen: 100 ccm Milch wurden mit 200 ccm Alkohol unter Umrühren gefällt; nachdem sich der Niederschlag gut abgesetzt hatte, wurde filtriert, das Filter samt Niederschlag in die Hülse eines Soxhlet-Apparates gebracht und nun mindestens ca. 30 Stunden mit Chloroform ausgezogen. Das alkoholische Filtrat wurde bei 50 bis 60° C verdunstet, der Rückstand mit Chloroform bis zur Erschöpfung ausgezogen und dieser Auszug

mit dem zur Extraktion des Filters und Niederschlags benutzten Chloroformauszug vereinigt. Die vereinigten Auszüge wurden in der Platinschale verdunstet, der Rückstand mit Sodasalpetermischung vorsichtig verascht und in der Asche die Phosphorsäure als pyrophosphorsaure Magnesia über die Stufe des Ammoniummolybdophosphates bestimmt. Zur Untersuchung gelangten: Kuhmilch, Eselsmilch, Schafmilch, Stutenmilch, Ziegenmilch und Frauenmilch.

Die Frauenmilch stellte uns in liebenswürdigster Weise Herr Professor Dr. Schloßmann aus der hiesigen Kinderklinik zur Verfügung; Schaf- und Eselsmilch verdanken wir dem liebenswürdigen Entgegenkommen von Herrn Direktor Dr. Bolau vom hiesigen zoologischen Garten; wir verfehlen nicht, auch an dieser Stelle beiden Herren unsern herzlichsten Dank auszusprechen.

I. Kuhmilch.

Nr.	Fettgehalt in %	Gefundene $Mg_2P_2O_7$ in der Asche	Lecithingehalt in % der Milch
1.	2,531	0,005	0,0364
2.	2,5435	0,005	0,0364
3.	3,5595	0,007	0,0509
4.	3,5426	0,0068	0,0494
5.	2,8426	0,0098	0,0713
6.	2,9140	0,0090	0,0654
7.	3,5930	0,0070	0,0509
8.	3,5260	0,0078	0,0567
9.	2,2230	0,0100	0,0727
10.	2,8948	0,0160	0,1163
11.	2,7300	0,0130	0,0945
12.	4,1500	0,0076	0,0553
13.	4,0258	0,0074	0,0538
14.	3,0620	0,0110	0,0799
15.	2,9860	0,0093	0,0676
16.	1,9069	0,0080	0,0582
17.	1,8600	0,0074	0,0538
Mittel aus sämtl. Analysen:	3,0524	0,0087	0,0629

II. Eselsmilch.

Nr.	Fettgehalt in %	Gefundene $Mg_2O_7P_2$ in der Asche	Lecithingehalt in % der Milch
1.	0,5084	0,0010	0,0073
2.	0,5160	0,0010	0,0073
3.	0,6992	0,0008	0,0058
4.	0,6484	0,0008	0,0058
5.	2,1580	0,0058	0,0322
6.	2,1130	0,0054	0,0393
Mittel aus sämtl. Analysen:	1,1071	0,0025	0,0165

III. Schafsmilch.

Nr.	Fettgehalt in %	Gefundene $Mg_2P_2O_7$ in der Asche	Lecithingehalt in % der Milch
1.	7,7170	0,0070	0,0509
2.	7,9490	0,0082	0,0596
3.	6,0132	0,0076	0,0553
4.	9,8179	0,0230	0,1672
Mittel aus sämtl. Analysen:	7,8742	0,0115	0,0833

IV. Stutenmilch.

Nr.	Fettgehalt in %	Gefundene $Mg_2P_2O_7$ in der Asche	Lecithingehalt in % der Milch
1.	0,1630	0,0012	0,0087
2.	0,1720	0,0010	0,0073
3.	0,1604	0,0014	0,0102
4.	0,1570	0,0012	0,0087
5.	0,2494	0,0014	0,0102
6.	0,2320	0,0012	0,0087
7.	0,2126	0,0022	0,0160
8.	0,1916	0,0024	0,0174
Mittel aus sämtl. Analysen:	0,1923	0,0015	0,0109

V. Ziegenmilch.

Nr.	Fettgehalt in %	Gefundene $Mg_2P_2O_7$ in der Asche	Lecithingehalt in % der Milch
1.	3,6716	0,0050	0,0364
2.	3,8780	0,0052	0,0378
3.	3,4936	0,0054	0,0393

Nr.	Fettgehalt in %	Gefundene $Mg_2O_7P_2$ in der Asche	Lecithingehalt in % der Milch
4.	3,3848	0,0050	0,0364
5.	3,3200	0,0048	0,0349
6.	4,6644	0,0060	0,0436
7.	4,7050	0,0078	0,0567
8.	4,3616	0,0072	0,0523
9.	4,4966	0,0078	0,0567
10.	4,4581	0,0093	0,0676
11.	4,6260	0,0108	0,0753
Mittel aus sämtl. Analysen:	4,0963	0,0068	0,0488

VI. Frauenmilch.

Nr.	Fettgehalt in %	Gefundene $Mg_2P_2O_7$ in der Asche	Lecithingehalt in % der Milch
1.	4,8424	0,0100	0,0727
2.	4,7316	0,0110	0,0799
3.	5,8494	0,0078	0,0567
4.	5,8440	0,0084	0,0611
5.	5,1140	0,0056	0,0407
6.	5,1140	0,0060	0,0436
7.	4,4647	0,0067	0,0487
8.	4,6324	0,0062	0,0451
9.	4,4846	0,0036	0,0262
10.	4,3932	0,0033	0,0240
Mittel aus sämtl. Analysen:	4,9470	0,00686	0,0499

Der Übersicht halber fügen wir eine vergleichende Tabelle der bei unseren Untersuchungen erhaltenen Werte für die verschiedenen Milcharten hier an.

Milchart	Fettgehalt in %			Lecithingehalt in %			Zahl der Analysen
	Maxim.	Minim.	Mittel	Maxim.	Minim.	Mittel	
Frauen . . .	5,8494	4,3932	4,9470	0,0799	0,0240	0,0499	10
Kuh	4,1500	1,8600	3,0524	0,1163	0,0364	0,0629	17
Esel	2,1580	0,5084	1,1071	0,0393	0,0058	0,0165	6
Schaf	9,8179	6,0132	7,8742	0,1672	0,0509	0,0833	4
Ziege	4,7050	3,3200	4,0963	0,0753	0,0364	0,0488	11
Stute	0,2494	0,1570	0,1923	0,0174	0,0073	0,0109	8

Über den Einfluß des Toluylendiamins auf die Ausscheidung des Cholesterins in der Galle.

Von

Chasoburô Kusumoto.

(Aus dem chemischen Laboratorium des physiologischen Instituts zu Breslau.)

(Eingegangen am 1. September 1908.)

Das Cholesterin ist bekanntlich ein wesentlicher Bestandteil der Galle. Seine Mengen sind klein; es findet sich aber in der Galle mit derselben Regelmäßigkeit wie der Gallenfarbstoff und die Gallensäuren. Wie es in die Galle gelangt und woher es stammt, ist bisher unbekannt.

Hier liegt nun folgender Gedanke nahe. Wir wissen, daß die roten Blutkörperchen Cholesterin, und zwar nach Versuchen, welche E. Hepner[1]) unter der Leitung von F. Röhmann anstellte, nur Cholesterin, keine Cholesterinester enthalten. Die Menge ist auch hier klein. Sie beträgt in 100 Teilen Trockensubstanz für die roten Blutkörperchen des Pferdes 0,275 g, für die des Hundes 0,552 g, in 100 Teilen feuchter Substanz 0,1156 bez. 0,1926 g. Weiter wissen wir, daß stetig eine gewisse Menge von roten Blutkörperchen in der Leber zugrunde geht, aus denen sich der Gallenfarbstoff bildet.

Stammt nicht vielleicht auch das Cholesterin, welches mit der Galle ausgeschieden wird, von diesen roten Blutkörperchen her? Diese Frage müßte mit sehr großer Wahrscheinlichkeit bejaht werden, wenn es gelänge nachzuweisen, daß ein gesteigerter Zerfall der roten Blutkörperchen im Körper, wenn er zu einer Steigerung der Ausscheidung von Gallenfarbstoff führt,

---

[1]) E. Pflüger, Arch. f. d. ges. Physiol. 73, 595, 1898.

auch eine Zunahme der Cholesterinausscheidung zur Folge hat. Das ist nun tatsächtlich der Fall.

M. Afanassiew[1]) hat seinerzeit im physiologischen Institut zu Breslau den Nachweis geliefert, daß Toluylendiamin, dessen Eigenschaft, Ikterus zu erzeugen, von O. Schmiedeberg entdeckt und von Stadelmann[2]) im Laboratorium O. Schmiedebergs näher untersucht worden war, die roten Blutkörperchen in näher beschriebener Weise schon innerhalb der Blutbahn zerstört.

Dieser Untergang von roten Blutkörperchen sei die Ursache zunächst für die von Stadelmann im Beginn der Toluylendiaminwirkung beobachtete Polycholie. Die Polycholie ist aber nach Stadelmann nur eine vorübergehende. Sehr bald ändern sich die normalen physikalischen Eigenschaften der Galle. Sie wird sehr zähe und dunkel. Die Menge ihrer festen Bestandteile nimmt zu. Die Zähigkeit — nach Afanassiew im Verein mit gewissen von ihm beobachteten Veränderungen im Lebergewebe — führe zu einer Behinderung des Gallenabflusses und, da die Gallenbildung vielleicht sogar in einem gegen die Norm verstärkten Maße vor sich geht, zum Ikterus. Hört die Toluylenwirkung auf, so kann nach Afanassiew mit der Beseitigung der Hindernisse, die dem Gallenabfluß entgegenstehen, die Menge der Galle wieder zunehmen und vielleicht über die Norm steigen.

Diese Angaben, nach denen unter dem Einfluß des Toluylendiamins eine Polycholie eintritt, die auf einer Zerstörung der roten Blutkörperchen beruht, machten es sehr wahrscheinlich, daß mit dem Gallenfarbstoff auch das in den roten Blutkörperchen enthaltene Cholesterin zur Ausscheidung durch die Galle gelangte. Dies ist, wie die folgenden, auf Veranlassung von Herrn Prof. Roehmann unternommenen Versuche zeigen, tatsächlich der Fall.

Zu diesen Versuchen dienten Hunde mit permanenter Gallenfistel. Die Operation wurde genau nach den Vorschriften von A. Dastre[3]) ausgeführt (procédé en un temps). Zwei Mißerfolge hatten wir anfangs dadurch, daß die mit dem Troi-

[1]) Zeitschr. f. klin. Med. 6.

[2]) Arch. f. experim. Pathol. u. Therap. 14, 231, 422, 1881.

[3]) Opération de la fistule biliaire. Arch. de Physiol. 22, 722, 1890.

kart angelegte Stichwunde, durch welche die Kanüle hindurchgeführt wurde, zu nahe dem Schwertfortsatz oder dem Rippenbogen zu liegen kam. Die innere Platte der Kanüle, die anscheinend in einer Tasche zwischen den Bauchdecken lag, rutschte eines Tages über den Knochen und ließ sich nicht wieder in ihre vorherige Lage zurückbringen. Der Gallenabfluß war unmöglich und der Versuch verloren.

Auf die Notwendigkeit der Antisepsis weist bereits Dastre hin. Ich schraubte nach der Operation anfangs jeden Tag, später jeden zweiten Tag die äußere Platte der Kanüle ab und reinigte sie sowie die Wunde gründlich mit Carbolwasser. Auch die Ansatzschläuche sowie der Ballon, der zum Auffangen der Galle diente, wurde jedesmal mit Carbolwasser oder Alkohol gereinigt. Nach jeder Entleerung wurde auch das Innere des Ballons mit Alkohol ausgewaschen. Der Alkohol wurde bei der Extraktion der Galle (s. u.) verwendet. Die entleerte Galle zeigte keine Spuren einer Zersetzung. Eine Cholecystitis trat nicht ein.

Einen weiteren Versuch verloren wir dadurch, daß ein Hund sich durch Kratzen mit der Pfote die Kanüle herausriß. Den Hunden wurde deshalb ein Schurz angelegt, der aus einem viereckigen Stück Leinwand bestand, mit Löchern zum Durchstecken der Beine und einer sackförmigen Erweiterung in der Mitte, in welcher der äußere Teil der Kanüle mit dem gebogenen Ansatzstück für den Schlauch lag. Dieser Schurz wurde von Bändern gehalten, die über dem Rücken zugebunden wurden. Zum weiteren Schutze der Kanüle und des Ausflußrohres wurde den Hunden ein Maulkorb angelegt.

Bei gut gelungener Operation zeigen die Hunde ihre gewöhnliche Freßlust und halten sich bei geeigneter Fütterung dauernd auf ihrem Körpergewicht. Die Galle läßt sich ohne jeden Verlust gewinnen.

In den folgenden Versuchen wurde der Ballon, in dem sich die Galle ansammelte, morgens und abends entleert.

Die 24stündige Menge wurde gemessen und ihr spezifisches Gewicht bestimmt. Sie wurde auf dem Wasserbade eingeengt und wiederholt mit Alkohol abgedampft, um das Wasser ohne zu starke Erhitzung möglichst vollkommen zu entfernen. Dann wurde mit einer entsprechenden Menge Alkohol extrahiert, filtriert

und das Filter gewaschen. Die alkoholischen Flüssigkeiten wurden auf 80 ccm eingeengt und diese mit der gleichen Menge Wasser verdünnt. Diese wässerig alkoholische Lösung wurde mit Petroläther extrahiert. Hierbei wurde anfangs im Schütteltrichter geschüttelt, dann ein Schwarzscher Apparat benutzt. Viel zweckmäßiger erwies sich aber das folgende Verfahren, welches dem von Kumagawa und Sutō[1]) empfohlenen ähnlich ist: In einen entsprechend großen Soxhletapparat stellte ich eine Flasche von etwa 240 ccm Inhalt mit der zu extrahierenden Flüssigkeit und einen Trichter, dessen langer Fuß bis auf den Boden der Flasche reichte. Am unteren Rande des letzteren befanden sich einige Einschnitte. An der Soxhletröhre wurde in gewöhnlicher Weise der Kühler und der entsprechend große Kolben mit Petroläther befestigt. Beim Erhitzen auf dem geschützten Wasserbade verdampft der Petroläther. Die Dämpfe werden im Kühler kondensiert. Der Petroläther fällt auf den Trichter. Bei entsprechender Länge des Trichterfußes genügt der Überdruck, um das Lösungsmittel durch die zu extrahierende Flüssigkeit zu treiben. Mit der zu extrahierenden Substanz beladen, läuft es über den Rand der Flasche, erfüllt den Raum zwischen Flasche und Soxhletrohr und gelangt durch den Heber des Soxhletrohres in die Kochflasche.

Nach 9 bis 10 Stunden wurde der Petroläther abdestilliert und der Rückstand zur Verseifung der Fette uud etwa vorhandener Cholesterinester mit 25 ccm halbnormaler, alkoholischer Kalilauge verseift. Dann wurde mit Halbnormalsalzsäure neutralisiert und mit Petroläther im Scheidetrichter geschüttelt. Statt zu schütteln hätte man selbstverständlich auch den obigen Apparat benutzen können. Der Petroläther wurde abdestilliert, der Rückstand auf kochendem Wasserbade im Leuchtgasstrome getrocknet und in trocknem Äther gelöst. Der Äther wurde filtriert und in einem gewogenen Gläschen verdunstet. Der Rückstand wurde eine Zeit auf kochendem Wasserbade erhitzt, in einen Schwefelsäureexsiccator gestellt und nach eingetretener Gewichtskonstanz gewogen. Er war fast farblos oder nur wenig gelbbräunlich gefärbt. Um mich davon zu überzeugen, daß

---

[1]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 4, 185, 1904.

er wesentlich aus Cholesterin bestand, vereinigte ich eine Anzahl der gewonnenen Proben und löste sie in ein wenig heißem Alkohol. Beim Erkalten schieden sich nur Krystalle von der Form des Cholesterins aus. Die Mutterlauge war sehr gering.

Der Schmelzpunkt der Substanz, welche bei Hund I in den ersten 5 Tagen nach der Injektion von Toluylendiamin ausgeschieden wurde, war 143° C. Das Cholesterin war also fast rein. Bei Hund II schmolz die Substanz, die in 8 Tagen nach der ersten Injektion ausgeschieden wurde bei 140°, die in 7 Tagen nach der zweiten Injektion bei 141°, die in 6 Tagen nach der dritten Injektion ebenfalls bei 141°.

Das Toluylendiamin 1 $(CH_3)C_6H_3\langle{}^{NH_2\,2}_{NH_2\,4}$ war von C. A. F. Kahlbaum in Berlin bezogen. Es wurde in wässeriger Lösung unter die Haut gespritzt.

Das Verhalten, welches die Ausscheidung des Cholesterins in der Galle vor und nach der Einspritzung des Toluylendiamins zeigt, ergibt sich aus folgenden Tabellen.

Versuch I.

Gallenfistelhund I, operiert am 4. März 1908.

Datum 1908	Körpergewicht g	Gallenmenge ccm	Cholesterin g	Bemerkungen
15. März	15,2	227	0,0549	Der Hund erhält
16. „	15,2	248	0,0797	täglich 600 g
17. „	15,0	212	0,0618	Pferdefleisch und
18. „	14,8	236	0,1384	120 g Semmel.
19. „	14,5	253	0,1060	Am 16. März
20. „	14,5	290	0,1190	Injektion von
21. „	14,5	186	0,0881	0,1 g Toluylen-
22. „	14,3	151	0,0523	diamin.
23. „	14,5	200	0,0511	
24. „	14,3	186	0,0605	

Die Einspritzung des Toluylendiamins bewirkt, daß am Tage nach der Injektion die Gallenmenge vermindert ist. Am zweiten Tage steigt die Gallenmenge nur wenig. Die Menge des Cholesterins ist aber um mehr als das Doppelte vermehrt. Am dritten und vierten Tage steigt die Gallenmenge noch weiter an. Die Menge des Cholesterins bleibt vermehrt. Dann sinkt die Gallenausscheidung und mit ihr die des Cholesterins.

Versuch II.

Gallenfistelhund II, operiert am 24. Juni 1908.

Periode 1.

Datum 1908	Körpergewicht kg	Gallenmenge ccm	Spezifisches Gewicht	Cholesterin g	Bemerkungen
2. Juli	14,7	180	1014	0,0750	Der Hund erhält
3. „		171	1012	0,0442	vom 1. bis 9./VII.
4. „		120	1010	0,0687	einschließlich
5. „	14,5	170	1012	0,0463	täglich 500 g
6. „		112	1007	0,0307	Fleisch u. 225 g
7. „		115	1011	0,0264	Semmel.
8. „	14,3	132	1014	0,0294	Am 5./VII.
9. „		150	1013	0,0373	werden 0,1 g
10. „		192	1012	0,0523	Toluylendiamin
11. „	14,5	223	1012	0,0761	unter die Haut
12. „		182	1009	0,0484	gespritzt.
13. „		235	1012	0,0969	

Das Toluylendiamin bewirkt hier ein deutliches Absinken der Gallen- und der Cholesterinmenge. Es nimmt dann an den folgenden Tagen die Gallen- und die Cholesterinmenge zu. Vom 10. Juli ab ist die Gallenmenge, vom 11. Juli vielleicht auch die Cholesterinmenge größer als in der Vorperiode. Der Versuch ist aber nicht einwandfrei, da vom 10. Juli ab die Menge des gefütterten Fleisches gesteigert worden war. Auch könnte man sagen, daß es sich in diesem Versuche nur um eine vorübergehende Retention gehandelt habe. Nimmt man nämlich das Mittel aus der Cholesterinausscheidung in den vier Tagen vor der Toluylendiamineinspritzung und ebenso von den folgenden acht Tagen, so beträgt die Cholesterinausscheidung für den Tag der Vorperiode 0,0585 g, für den der Toluylendiaminperiode 0,0495 g.

Den Unterschied dieser Versuchsreihe im Vergleich zu der vorhergehenden, der für uns wesentlich in der länger anhaltenden Verminderung der Gallensekretion und Cholesterinausscheidung bestand, erklärten wir uns durch die Annahme, daß für diesen Hund II die Menge des verwendeten Toluylendiamins eine zu große war. Wir gaben deshalb in den folgenden beiden Perioden nur ein Drittel bzw. ein Viertel von der in der ersten Periode angewendeten Dosis.

Periode 2.

Datum 1908	Körpergewicht kg	Gallenmenge ccm	Spezifisches Gewicht	Cholesterin g	Bemerkungen
14. Juli	14,7	175	1010	0,0556	Der Hund erhält
15. „		237	1009	0,0526	600 g Fleisch und
16. „		226	1010	0,0416	250 g Semmel.
17. „		190	1011	0,0384	Am 16./VIII.
18. „	14,5	126	1005	0,0472	werden 0,033 g
19. „		239	1012	0,0516	Toluylendiamin
20. „		251	1012	0,0630	unter die Haut
21. „	14,5	240	1012	0,1031	gespritzt.
22. „		246	1010	0,0945	
23. „		235	1011	0,0674	

In dieser Periode bewirkt das Toluylendiamin wieder ein Absinken der Gallensekretion, die besonders am zweiten Tage nach der Injektion eine sehr bedeutende ist. Gleichzeitig sinkt auch das spezifische Gewicht, also die Summe der festen Bestandteile sehr beträchtlich. Die Cholesterinausscheidung sinkt aber nicht oder nur vorübergehend, sie nimmt zu und erreicht innerhalb des fünften Tages ein Maximum, von dem sie im Laufe zweier weiterer Tage absinkt.

Periode 3.

Datum 1908	Körpergewicht kg	Gallenmenge ccm	Spezifisches Gewicht	Cholesterin g	Bemerkungen
24. Juli		218	1013	0,0518	Der Hund erhält
25. „	15,0	210	1010	0,0480	täglich 600 g
26. „		243	1014	0,0771	Pferdefleisch
27. „		273	1013	0,0880	und 250 g
28. „		207	1013	0,0910	Semmel.
29. „	15,0	266	1012	0,0640	Am 25./VIII.
30. „		270	1010	0,0707	werden 0,025 g
31. „		248	1011	0,1132	Toluylendiamin
1. August		249	1008	0,0582	unter die Haut
2. „	15,5	246	1011	0,0609	gespritzt.

Nach Einspritzung der noch kleineren Dosis von Toluylendiamin vermindert sich die Gallenmenge nicht. Im Gegenteil die Gallenmenge nimmt zu und mit ihr die Menge des Chole-

sterins. Das Maximum erreicht die letztere erst am sechsten Tage nach der Einspritzung des Toluylendiamins, zu einer Zeit, wo die Gallenmenge wieder sinkt.

Fassen wir das Ergebnis dieser Versuche zusammen, so sehen wir, daß in Übereinstimmung mit den Angaben von Stadelmann und Afanassiew unter dem Einfluß nicht zu kleiner Dosen von Toluylendiamin eine Verminderung der Gallensekretion eintritt. Diese war aber in unseren Versuchen nicht mit einer sichtbaren Änderung in den physikalischen Eigenschaften der Galle verbunden. Die Galle war nicht schleimig, zäh und dickflüssig, sondern behielt ihre normale Konsistenz. Die Konsistenzänderung ist also in unseren Versuchen nicht die Ursache für die Verminderung der Gallensekretion. Diese ist anscheinend bedingt durch eine unmittelbare oder mittelbare Einwirkung des Toluylendiamins auf die sezernierenden Elemente der Leber.

Auf die Verminderung der Gallensekretion folgt eine Zunahme, bei der die Norm überschritten wird. Die Polycholie ist aber bei den von uns angewendeten Dosen keine sehr große.

Bei sehr kleinen Dosen Toluylendiamin kann die Verminderung der Gallensekretion fehlen und die Menge der ausgeschiedenen Galle sofort zunehmen.

Die für uns wichtigste Beobachtung ist aber, daß unter dem Einfluß des Toluylendiamins eine Steigerung der Cholesterinausscheidung eintritt. Um eine Vorstellung von ihr zu erhalten, machen wir folgende Rechnung:

In Versuch I wurden an den beiden Vortagen ausgeschieden im Durchschnitt für den Tag 0,0673, an den fünf Tagen, welche der Toluylendiamininjektion folgen, im ganzen 0,5133 g. Ziehen wir hiervon $5 \times 0{,}0673 = 0{,}3365$ g ab, so beträgt die Mehrausscheidung 0,1768 g Cholesterin.

In Versuch II Periode 2 wurden im Mittel aus den 3 Tagen der Vorperiode für den Tag ausgeschieden 0,0499 g Cholesterin, in den 7 Tagen nach der Einspritzung des Toluylendiamins 0,4652 g. Ziehen wir hiervon $7 \times 0{,}0499 = 0{,}3493$ g ab, so beträgt die Mehrausscheidung 0,1159 g Cholesterin.

In Versuch II Periode 3 wurden im Mittel aus den zwei, der Toluylendiamineinspritzung vorhergehenden Tagen ausgeschieden 0,0499 g, in den 8 der Toluylendiamineinspritzung folgenden Tagen im ganzen 0,6131 g. Ziehen wir hiervon

$8 \times 0{,}0499 = 0{,}3992$ g ab, so beträgt die Mehrausscheidung 0,2239 g Cholesterin.

Wir wollen nun weiter berechnen, wieviel rote Blutkörperchen zerstört worden sein müßten, um das ausgeschiedene Cholesterin zu liefern.

Nach den oben angeführten Bestimmungen von E. Hepner enthalten die roten Blutkörperchen vom Hunde 0,1926 °/₀ Cholesterin. Nehmen wir denselben Gehalt für die Blutkörperchen unserer Hunde an, so wären in Versuch I etwa 90 ccm, in Versuch II Periode 2 etwa 60 ccm, in Periode 2 etwa 115 ccm rote Blutkörperchen unter dem Einfluß des Toluylendiamins zerstört worden. Eine derartige Zerstörung von roten Blutkörperchen würden die 14 bis 15 kg schweren Hunde sehr leicht ertragen können. Unserer Annahme, daß das Cholesterin von den roten Blutkörperchen herrührt, steht also nichts entgegen. Auffallend ist, daß die Zunahme der Cholesterinausscheidung in der Versuchsreihe II erst eine Reihe von Tagen nach der Toluylendiamininjektion ihren Höhepunkt erreicht. Es könnte dies darauf beruhen, daß Cholesterin, selbst wenn es als solches in dem Lebergewebe enthalten ist, nur langsam zur Ausscheidung gelangt. Es wäre aber auch möglich, daß die Trümmer der roten Blutkörperchen die durch das Toluylendiamin entstehen, vorübergehend in anderen Organen, z. B. der Milz oder dem Knochenmark, wie dies Afanassiew beobachtete, liegen bleiben, daß sie hier allmählich weiter umgewandelt werden und das Cholesterin mit den Vorstufen des Gallenfarbstoffs erst nach und nach der Leber zugeführt wird. Genauere Bestimmungen des Gallenfarbstoffs und weitere Beobachtungen wären auch mit Rücksicht hierauf nicht ohne Interesse.

Wir sehen in unseren Versuchen eine Stütze für die Annahme, daß das Cholesterin, welches mit der Galle ausgeschieden wird, mindestens zum Teil von den roten Blutkörperchen abstammt, die tagein tagaus im Leben der Tiere zugrunde gehen. Es ist wie der Gallenfarbstoff eine für den Stoffwechsel wertlose Substanz, ein Schlacke, deren sich der Körper mit der Galle entledigt.

Berichtigung einer Angabe über Hämatolyse.

Von

L. v. Liebermann.

(Eingegangen am 4. September 1908.)

Durch die Arbeit von Max Friedemann und Fritz Sachs (Diese Zeitschr. 12, 259, 1908) bin ich auf einen bedauerlichen Schreibfehler aufmerksam gemacht worden, der sich in meiner Publikation über Hämagglutination uud Hämatolyse (Diese Zeitschr. 4, 37, Arch. f. Hygiene 62, 339) findet und von den genannten Autoren als Irrtum erkannt wurde. Dieser soll nun berichtigt werden.

Um ein auf Schweineblutkörperchen hämatolytisch wirkendes Schweineblut zu erhalten, müssen zu 10 ccm Schweineblutserum 0,05 ccm reine Ölsäure, nicht aber Ölsäureemulsion zugesetzt werden, wie dies in meinen oben zitierten Mitteilungen infolge eines Schreibfehlers zu lesen ist.

Meine Angaben an den erwähnten Stellen sind aber auch insofern ungenau, als die Reihenfolge der Zusätze, die — wie ich das auf den nächsten Seiten meiner obenerwähnten Mitteilungen selbst angegeben habe, und wie dies auch Friedemann und Sachs bestätigen konnten — so wichtig ist, dort unerwähnt geblieben war.

Es tritt nämlich nur dann Hämatolyse ein, wenn man 2 ccm der Blutkörperchenemulsion vorerst mit 1 ccm der aus 10 ccm Serum und 0,05 ccm Ölsäure bereiteten Emulsion = A vermischt und erst dann die übrigen 2 ccm Normalschweineserum zufügt. Ergänzend sei noch bemerkt, daß diese schon bei Zimmertemperatur sofort zu beobachtende Lyse nicht eintritt, wenn A eine halbe Stunde auf 56° erwärmt wird; erst nach

$^3/_4$stündigem Stehen im Thermostaten zeigen sich Spuren von Hämatolyse.

Ich behalte mir vor, auf diese sowie auch auf andere Beobachtungen, die durch die interessanten Mitteilungen von v. Dungern und Coca sowie Friedemann und F. Sachs veranlaßt wurden, bei einer anderen Gelegenheit zurückzukommen.

Herren Friedemann und Sachs aber bin ich zu Dank verpflichtet, da sie mir durch ihre sorgfältige Nachprüfung zu dieser Berichtigung Gelegenheit gegeben haben.

Verwertung der Energie des Rauhfutters in Beziehung zur Umgebungstemperatur und zum Ernährungszustande der Kaninchen.

Vorläufige Mitteilung.

Von

W. Ustjanzew und G. Bogajewsky.

(Aus dem zootechnischen Laboratorium des land- und forstwirtschaftlichen Instituts zu Nowo-Alexandria.)

(Eingegangen am 14. August 1908.)

Einleitung.

Die im Anfange der achtziger Jahre des vorigen Jahrhunderts ausgeführten klassischen Arbeiten Rubners auf dem Gebiete der Energetik der Ernährung begründeten eine neue Phase der Ernährungslehre. Seine calorimetrischen Forschungen über den Stoffwechsel bei den Carnivoren haben das Verständnis der Prozesse der Oxydation und des Zerfalls, unter deren Einwirkung die vom Tiere aufgenommenen Nährstoffe sich in eine Quelle der Lebenstätigkeit des Organismus verwandeln, sehr gefördert. Die Untersuchung nur des Stoffwechsels, deren Aufgabe auf die Erforschung des Stickstoff- und Kohlenstoffumsatzes beschränkt wird, erlaubt uns noch nicht, eine klare Vorstellung weder von der Verwertung der aufgenommenen Nährstoffe noch von der produktiven Tätigkeit des Tieres zu bilden. Um den Nutzeffekt eines Nährstoffes festzustellen, genügt es nicht, nur die quantitativen Veränderungen zu erforschen, welche im Stickstoff- und Kohlenstoffumlaufe stattfinden, sondern wir müssen auch den Energieumsatz bestimmen. Einen besonders wichtigen Dienst hat uns die Anwendung des energetischen Prinzips in der Bestimmung des Nährwertes der

Futtermittel erwiesen. Die gegenwärtige chemische Untersuchung der vegetabilen Futtermittel gibt uns bisher nur die Möglichkeit, dieselben in einzelne große ungleichartige Nährstoffgruppen zu zerlegen, von denen sich keine in verschiedenen Futtermitteln als gleichwertig erweist. Diese Ungleichwertigkeit der Gruppen wird auch in dem Falle nicht aufgehoben, wenn man die verdauten Teile der Futtermittel vergleicht. Daher kann man die Methode der Bestimmung der verdauten Nährstoffe in den Futtermitteln nicht als genügend erachten, um über ihren Nährwert zu urteilen. Die Bestimmung des Energieumsatzes, die Rubner bei der Untersuchung der Ernährungsprozesse der Carnivoren angewandt hat, zeigte vor allem, daß ein gewisser Teil der Energie, die in den verdauten Nährstoffen enthalten ist, vom Organismus im Harne ausgeschieden wird. Dies war der erste Fortschritt in der Schätzung der Nährstoffe vom Standpunkte der Energitik der Ernährung. Als Maßstab der nützlichen Wirkung eines Futtermittels wäre somit die Energie zu betrachten, welche der Wärme der physiologischen Verbrennung oder, nach der Terminologie Rubners, dem „physiologischen Nutzeffekt“ des Futtermittels entspricht. Diese Differenz zwischen der Energie des verdauten Teiles und wirklich nützbaren Energie muß besonders auffallend bei den Herbivoren sein. Die vorwiegende Fütterung der Wiederkäuer mit schwer verdaulichen Stoffen hat zur Folge 1. die Ausscheidung von Hippursäure im Harn, 2. das lange Verweilen der Futtermasse im Darmkanal, verbunden mit Fäulnis- und Gärungsprozessen, die eine ausgiebige Ausscheidung des Methans, Wasserstoffs und anderer Gase bewirken.

Untersuchungen von großer Bedeutung, welche die Verwertung der Energie der Nährstoffe und der Futtermittel überhaupt durch die Herbivoren und besonders durch die Wiederkäuer beleuchten, hat O. Kellner auf der Versuchsstation zu Möckern und teilweise auch H. Armsby in Pennsylvanien ausgeführt.

Diesen beiden Autoren und besonders Kellner gebührt das Verdienst, eine neue Richtung in der Lehre von den Futtermitteln eingeschlagen zu haben, die darin besteht, daß der Gehalt an nützbaren Energie, den die einzelnen Nährstoffe und Futtermittel dem Organismus darbieten können, auf calorimetrischem Wege bestimmt wird.

Die neue Methode der Beurteilung des Nährwertes der Futtermittel durch die Energiebestimmung erschöpft wohl noch lange nicht diese komplizierte Frage, aber sie bedeutet einen großen Fortschritt auf diesem Gebiete.

Als physiologischen Nutzeffekt eines Futtermittels bezeichnet Kellner diejenige Quantität der Energie in Calorien, die von dem verdaulichen Teile eines Futters im Organismus des Tieres zurückbleibt. Um diese Größe zu erhalten, bestimmt der erwähnte Autor die Energie des verdauten organischen Teiles des Futters (mittels Gegenüberstellung des Wärmewertes des Futtermittels und der von demselben erhaltenen Exkremente), von der sie alsdann die im Harn und im Methan vorhandene Energie abziehen. Rubners Forschungen bei den Carnivoren haben erwiesen, daß die Gesetze des Energieverbrauchs zwischen dem Ablaufe der Prozesse im Zustande der chemischen Wärmeregulation und den Prozessen bei der physikalischen Regulation streng zu scheiden haben.

Im ersten Falle, wenn das Tier unter einer mittleren Umgebungstemperatur sich befindet und ein für den Bedarf im Hungerzustande nicht überschreitendes Futterquantum erhält, vertreten die Nährstoffe die Bestandteile des Organismus in Quantitäten, die der Wärme ihrer physiologischen Verbrennung äquivalent sind. Dies ist das sogenannte Gesetz der isodynamen Vertretung der Nährstoffe, demzufolge das Eiweiß, das Fett und die Kohlehydrate des Futters im Organismus einander ersetzen können und die Körpergewebe vor der Zersetzung in demselben Verhältnis bewahren, in welchem die physiologisch nutzbare Energie in ihnen vertreten ist. Wenn aber das Tier bei einer nicht hohen äußeren Temperatur soviel Futter erhält, als es nur für die innere physiologische Arbeit und für die Erhaltung der Körpertemperatur einigermaßen ausreichend ist, so wird der physiologische Nutzwert der Nährstoffe von dem Organismus vollständig verwertet und kann als Maßstab des Nährwertes derselben gelten.

Ein ganz anderes Bild bietet sich bei ausgiebiger Ernährung und auch bei hoher Lufttemperatur (30 bis 33° C) dar, wo der Stoffverbrauch sich schon unter dem Einflusse der physikalischen Regulation befindet. In diesen Fällen tritt eine Steigerung der Wärmeabgabe ein, die im Zusammenhange mit

dem Charakter und der Menge des Futters bald größer, bald kleiner ist.

Besonders bemerkbar wird die Steigerung des Energieumsatzes bei der Fütterung mit Fleisch. Nach Rubners Versuchen läßt sich schon bei einem unbedeutenden Überschusse an Eiweiß, der das Bedürfnis des hungernden Tieres um 50% überragt, eine Steigerung der Wärmeproduktion um 19%, aber bei einem Überschusse von 19% eine Steigerung um 49% beobachten.[1])

Was die stickstoffreien Stoffe — die Fette und die Kohlenhydrate — anbetrifft, so steigern diese auch die Abgabe der Wärme des Tieres, aber in weit geringerem Grade als das Eiweiß und nur im Falle eines recht großen Überschusses derselben im Vergleich zu dem beim Hungern unentbehrlichen Quantum.

Bei einem bis 128% betragenden Überschuß an Nahrung konstatierte Rubner folgende Steigerung der Wärmeabgabe: bei Fütterung mit Fleisch + 46,0%, mit Fett + 13,0%, mit Kohlenhydraten + 16,6%. Dieselbe betrug bei 50% Überschuß für Fleisch + 18,4%, Fett 3,0%, Kohlenhydrate + 3,5%.

Im letzten Falle ist die Steigerung des Energieumsatzes so gering, daß man annehmen kann, daß der Verbrauch der Nährstoffe sich mit dem Gesetze der isodynamen Vertretung in Einklang bringen läßt.

Die Fähigkeit einzelner Stoffe, die Wärmeproduktion bei ausgiebiger Aufnahme derselben zu steigern, bezeichnet Rubner als „eine spezifisch-dynamische Wirkung der Nährstoffe".

Ganz dasselbe Bild der spezifisch-dynamischen Wirkung der Nährstoffe tritt in dem Falle ein, wenn das Tier sich bei bei einer Lufttemperatur von 33° C, d. h. unter den Bedingungen der physikalischen Wärmeregulation befindet. In diesem Falle findet eine Steigerung der Wärmeausscheidung unter dem Einflusse der Nahrungsaufnahme schon dann statt, wenn die Menge der Nährstoffe den Hungerbedarf des Tieres nicht übersteigt.

Indem Rubner mit einem im Respirationscalorimeter bei einer Temperatur von 33° C sich befindlichen Hunde experimentierte und demselben verschiedene Nährstoffe gab, deren

---

[1]) Die Gesetze des Energieverbrauchs 1902, S. 90.

physiologischer Nutzwert in Calorien das Bedürfnis des Tieres beim Hungern nicht überstieg, konstatierte er folgende Zunahme des Wärmeproduktion[1]):

Für Fleisch 30,9 %
„ Fett 12,7 %
„ Zucker 5,8 %

Um also unter diesen Bedingungen einen Hund im Gleichgewichtszustande der Ernährung zu erhalten, genügt es nicht, auf jede 100 Cal., die das Tier im Hungerzustande abgibt, ebenfalls 100 Cal. Energie im Futter zu geben, sondern man muß mehr geben, und nämlich im Fleische 140 Cal., im Fett 114,5, im Zucker 106,4 Cal. Wie bei ausgiebiger Ernährung, so auch bei Erhaltungsfütterung, aber bei hoher Lufttemperatur weicht somit der Verbrauch der Nährstoffe im Organismus von dem Gesetze des isodynamischen Ersatzes merklich ab; ein beträchtlicher Teil des physiologischen Nutzwertes der Nahrungsmittel bleibt je nach ihrer spezifisch dynamischen Wirkung unausgenützt und vermehrt nur die Wärmeproduktion des Tieres. Es fragt sich nun, durch welche Momente die spezifisch dynamische Wirkung der Nährstoffe hervorgerufen wird. Es ist leider unmöglich, diese für die Ernährungstheorie so wichtige Frage schon jetzt mit Bestimmtheit zu beantworten.

Obwohl die Tatsache der Steigerung des Stoffwechsels unter dem Einflusse der Nahrungsaufnahme der Wissenschaft schon längst bekannt war, ist sie erst unlängst von N. Zuntz und seinen Mitarbeitern auf eine mehr oder minder wahrscheinliche Weise erklärt worden.

Indem Zuntz mit Kaninchen experimentierte und Nährstoffe bald in ihren Magen, bald unmittelbar in ihr Blut einführte, gelangte er zu dem Schlusse, daß die Zunahme des Stoffwechsels, die sich bei ausschließlicher Einführung der Nahrung in den Magen beobachten läßt, durch die Arbeit des Verdauungsapparats hervorgerufen wird. Es erscheint als sehr wahrscheinlich, daß neben der mechanischen Wirkung, die in einer verstärkten Verdauungsarbeit besteht, bis zu einem gewissen Grade auch eine spezifische, nämlich chemische Wirkung

[1]) Die Gesetze des Energieverbrauchs 1902, S. 334.

des Futters auf die Drüsenarbeit die Steigerung des Stoffwechsels verursacht.

Ohne auf die Ursachen der spezifisch dynamischen Wirkung der Nährstoffe einzugehen, können wir diese Erscheinung vom Standpunkte der Ernährungsenergetik betrachten, und zwar als einen Prozeß der Umwandlung eines Teiles der chemischen Energie in freie Wärme, die der Organismus für die physiologischen Funktionen der Zellen nicht verwerten kann, aber welche bei gewissen Bedingungen die Wärmeabgabe des Tieres steigert. Diese Auffassung entspringt aus den Bedingungen des Auftretens der spezifisch-dynamischen Wirkung des Futters. Wir haben oben ausgeführt, daß, wenn sich ein Tier in einer mittleren Lufttemperatur befindet, und wenn ihm ein Nährstoffquantum gereicht wird, das kaum das Bedürfnis des hungernden Tieres ausgleicht, so werden die Nährstoffe in Übereinstimmung mit der Theorie der isodynamen Vertretung verbraucht. Wenn aber die Temperatur der Außenluft 30° erreicht, so nimmt die Verwertung der Energie der Nährstoffe merklich ab, es tritt die Erscheinung einer Überproduktion der Wärme im Maße ihrer spezifisch dynamischen Wirkung ein. Aus der Gegenüberstellung dieser zwei Tatsachen wird man zu der Annahme geführt, daß bei der Oxydation der aufgenommenen Nahrung ein Teil ihrer chemischen Energie scheinbar für die Erzeugung derjenigen mechanischen und chemischen Arbeit der Verdauungsorgane verbraucht wird, mit welcher die Prozesse der Aufnahme, der Verdauung und der Absorption der Nahrung unbedingt verbunden sind. Der endgültige Zustand, den dieser Teil des physiologischen Nutzwerts annimmt, ist die Wärme, und nur als solche kann diese Energie, von O. Kellner als „termisch"[1]) benannt, durch das Tier utilisiert werden. Daher ist es verständlich, daß die Verwertung der termischen Energie nur in dem Falle stattfindet, wenn die Nahrungszufuhr dem Energieverbrauche des hungernden Tieres nicht völlig genügt und der Bedarf, die Körpertemperatur zu erhalten, in den Vordergrund tritt, d. h., wenn das Tier sich in einer niedrigen oder mittleren Temperatur befindet. In diesem Falle wird die termische Energie, wie dies das Gesetz der isodynamen Ver-

[1]) Die Ernährung der Nutztiere, 3. Aufl., S. 104.

tretung der Nährstoffe zeigt, ebenso vollständig verwertet, wie der andere Teil der nutzbaren Energie des Futters, welche Kellner als „dynamische Energie" bezeichnet. Gehen wir nun zur Betrachtung der Verwertung der Energie der Nährsoffe und speziell der Rauhfutter bei den Herbivoren über. Wenn man sich auf alles oben Ausgeführte beruft, so kann man a priori vermuten, daß bei den Herbivoren und besonders bei den Wiederkäuern, die sich vorzugsweise mit Rauhfutter ernähren, die sog. termische Energie der Nährstoffe besonders groß sein muß, und daß daher der Verwertungskoeffizient der physiologisch nutzbaren Energie der Futtermittel bei ausgiebiger oder produktiver Fütterung verhältnismäßig nicht groß ist. Die umfangreichen, sorgfältigen, an Ochsen auf der Station Möckern von O. Kellner ausgeführten Versuche[1]) haben in der Tat erwiesen, daß die Energie des Futters, die sich im Körper in die Energie des Fleisches und des Fettes umwandeln kann, nur einen Teil der gesamten umsetzbaren Energie (physiologischer Nutzwert) beträgt. Ein beträchtlicher Teil der letzteren und bei einigen besonders rauhen Futterarten sogar der größere Teil geht für das Tier ohne Nutzen verloren. Wir wollen hier die von Kellner[2]) erhaltenen magnetischen Äquivalente für einige als Zugabe zum Erhaltungsfutter verfütterte Futtermittel anführen:

1 g verdauten organischen Stoffs	Physiol. Nutzwert cal.	Produktionswert cal.	%
Eiweiß	4958	2241	45,2
Stärke	3760	2215	58,9
Heu	3728	1596	42,8
Haferstroh . . .	3747	1409	37,8
Winterweizenstroh	3327	592	17,8

Hieraus ersehen wir, daß die produktive Wirkung des Futters bestenfalls nur gegen 60% der in ihm entaltenen umsetzbaren Energie beträgt, für das Winterstroh aber beträgt der Koeffizient der nützlichen Wirkung bloß 17,8%, d. h. gegen 83% der aus dem Futter in den Organismus aufgenommenen Energie gehen bei der produktiven Fütterung für das Tier ohne Nutzen verloren.

[1]) Landw. Vers.-St. 53, 461.

[2]) Die Ernährung d. l. Nutztiere. 3. Aufl., S. 107.

Aus den angeführten Zahlen ist zu ersehen, welch ein gewaltiger Unterschied zwischen der gesamten physiologisch nützlichen Energie und dem Teile derselben besteht, der eine produktive Wirkung hat, d. h. welcher nur zur Bildung des Fleisches und Fettes im Körper dient. Obwohl Stärke, Heu und Stroh einen fast gleichen physiologischen Nutzwert enthalten, so ist ihr Produktionswert doch sehr verschieden.

Es fragt sich nun, unter welchen Bedingungen die „termische" Energie der Rauhfutter durch die Tiere ausgenutzt wird und ob sie überhaupt ausgenutzt werden kann. Da diese Energie einen sehr großen Prozentsatz der gesamten physiologisch nützlichen Energie ausmacht, so ist diese Frage wie für die Schätzung des Nährwertes des Futtermittels sowie auch für die Aufstellung von Normen bei der Erhaltungsfütterung von wesentlichem Interesse. Indem O. Kellner sich auf das Gesetz der isodynamen Vertretung beruft und eine Analogie zwischen der spezifisch-dynamischen Wirkung der Nährstoffe und der termischen Energie des Futters anführt, gelangt er zu der Vermutung, daß die letztere Form der Energie vollständig utilisiert wird, wenn das Tier Erhaltungsfutter erhält und sich in niedriger oder mittlerer Temperatur befindet. An einem schematischen Beispiele demonstriert O. Kellner[1]) die Möglichkeit, die termische Energie des Futters im Zusammenhange mit der Temperatur der umgebenden Luft zu verwerten. Je niedriger die Temperatur ist, desto größer ist der Energieverbrauch zur Erhaltung der Körpertemperatur und desto mehr Chancen bieten sich für die Verwertung der termischen Energie unter der Bedingung einer ungenügenden Fütterung dar. Mit der Steigerung der Temperatur nimmt die Möglichkeit ihrer nützlichen Wirkung ab, und bei 30° C, wenn der Bedarf des Tieres nach Temperatur ein Minimum erreicht, tritt endlich die Grenze der Verwertung der termischen Energie ein; die letztere geht für den Organismus verloren, indem sie nur die Wärmeproduktion vergrößert. Ganz anders gestalten sich die Bedingungen der Verwertung der Energie des Futters bei ausgiebiger Fütterung. In diesem Falle stehen gewöhnlich den Tieren allzu große Mengen der aus den Nähr-

[1]) Die Ernährung d. l. Nutztiere, 3. Aufl., S. 107.

stoffen entstehenden termischen Energie zur Verfügung, und die letztere bleibt völlig unverwertet. Der Nutzeffekt der über das Maß des Erhaltungsfutters gereichten Nahrung wird nur durch die Energiemenge bestimmt, die unmittelbar der Lebenstätigkeit der Zellen, dem Fett- und Fleischabsatze und überhaupt der produktiven Tätigkeit des Tieres zugute kommt. Die termische Energie des Ergänzungsfutters erweist sich als überflüssig, denn der Wärmebedarf zur Erhaltung der Körpertemperatur wird schon durch das Erhaltungsfutter gedeckt Somit erweisen sich eine nicht hohe Lufttemperatur und die Erhaltungsfütterung als die einzigen unentbehrlichen Bedingungen zur Erzeugung der nützlichen Wirkung der termischen Energie des Futters. Unter diesen Bedingungen wird der Nährwert des Futtermittels durch seinen gesamten Gehalt an physiologisch nützlicher Energie bedingt.

Dies sind O. Kellners theoretische Erwägungen, die leider durch Experimente nicht bestätigt sind. Die Untersuchungen von H. Armsby auf der Versuchstation in Pennsylvanien[1]) welche mit Ochsen zwecks Bestimmung des Produktionswertes des Timotheeheus ausgeführt worden sind, erlauben uns aber, Schlußfolgerungen zu ziehen, die mit den soeben angeführten Erwägungen Kellners nicht völlig übereinstimmen. H. Armsby benutzte für seine Versuche einen großen Respirationscalorimeter, der außer dem Stoffwechsel auch alle Veränderungen in den vom Tiere ausgeschiedenen Wärmemengen unmittelbar zu registrieren erlaubte; in dieser Hinsicht verdienen diese Forschungen besondere Beachtung. Ohne auf H. Armsbys Untersuchungen näher einzugehen, wollen wir nur die erhaltenen Resultate betrachten. Der Versuch zerfiel in 4 Perioden, in den ersten zwei war die Menge des aus Timotheeheu und etwas Leinmehl bestehenden Futters weit geringer, als es für die Erhaltungsfütterung erforderlich ist. Das Tier hungerte, dabei wurden die Bestandteile des Körpers, das Fleisch und das Fett, zerstört, deren Energie in der ersten Periode 2578 Cal., in der zweiten 791 Cal. betrug. Der Versuch wurde bei einer Lufttemperatur von 18°C ausgeführt. Es möchte scheinen, daß

---

[1]) U. S. Departament of Agriculture, Bureau of Animal Industry Bulletin Nr. 51. Landw. Jahrb. 33, 665.

bei diesen Bedingungen die umsetzbare Energie des Futtermittels durch das Tier vollständig utilisiert werden muß. Währenddessen hat aber die Steigerung der Timotheemenge in der zweiten Periode im Vergleich zur ersten auf 1282,5 g, was 2840 Cal. des physiologischen Nutzwertes des Heues entspricht, das vom Tiere ausgeschiedene Wärmequantum bedeutend erhöht. Die direkt im Calorimeter beobachtete Wärmeproduktion betrug nämlich in der ersten Periode 9215 Cal., in der zweiten 10296 Cal., d. h. 1081 Cal. mehr.

Somit läßt sich bei der Zunahme der Energie des Futters von 2840 Cal. eine Steigerung der Wärmeproduktion von 1081 Cal. beobachten, oder 37 % der umsetzbaren Energie gehen für das Tier unproduktiv verloren. Und die oben angeführten Größen des Fleisch- und Fettzerfalles in den beiden Perioden zeigen tatsächlich, daß die Menge der umsetzbaren Energie, d. h. der Energie, die zur Erhaltung der Bestandteile des Körpers unmittelbar dienen kann, in der zweiten Periode nur um 2578 Cal. — 791 Cal. = 1787 Cal. zugenommen hat. Von 2840 Cal. des Futters erweisen sich als wirklich nützlich nur 1787 Cal. oder 62,9 %. Hieraus geht hervor, daß bei ungenügender Ernährung und bei mittlerer Lufttemperatur noch lange nicht die gesamte physiologisch-nutzbare Energie des Rauhfutters durch das Tier verwertet werden kann. Auch in diesem Falle erweist sich ein gewisser Teil der thermischen Energie des Futters als physiologisch untätig, aber nur ein gewisser Teil, denn ein unzweifelhaft beträchtlicher Teil derselben wird gleich der dynamischen Energie des Futters utilisiert. Dies ergibt sich besonders deutlich aus demselben Versuche von Armsby. In der III. und IV. Periode wurde die Gabe des Timotheeusheus bedeutend erhöht; die umsetzbare Energie betrug im ersten Falle 11198 Cal., im zweiten 12106 Cal.; dabei trat eine Ablagerung des Fleisches und Fettes im Körper ein, deren Energie in der III. Periode 176 Cal., in der IV. 478 Cal. betrug. Folglich erhöhte eine Zunahme der Energie des Futters von 908 Cal. die Ablagerung des Fleisches und des Fettes um 302 Cal., d. h. die nützliche Wirkung der Energie betrug im ganzen 33,3 % gegenüber 62,9 % bei ungenügender Ration. Es ist klar, daß die thermische Energie des Rauhfutters eine gewisse produktive Wirkung bei ungenügender Ernährung zur Folge hat.

Vielleicht wäre der Koeffizient der nützlichen Wirkung des Futters viel größer, wenn der Versuch bei einer bedeutend niedrigeren Temperatur als 18° C ausgeführt wäre? Es ists möglich, daß bei einer mittleren Temperatur die Menge der thermischen Energie in der Futterration das Bedürfnis des Tieres für diese Energie bedeutend überwog, und in diesem Falle muß ihr Überschuß für das Tier ohne Nutzen verloren gehen, indem er nur die Wärmeproduktion steigert. Es ist sehr wahrscheinlich, daß zwischen der Umgebungstemperatur und dem Nutzeffekt des Rauhfutters irgendein Zusammenhang besteht. Mit der Abnahme der Temperatur steigert sich, wie bekannt, das Wärmebedürfnis des Tieres und muß scheinbar die Möglichkeit einer vollständigeren Verwertung der thermischen und folglich auch der gesamten physiologisch nützlichen Energie des Rauhfutters zunehmen.

Der Wunsch, die soeben angeführten theoretischen Erwägungen durch Experimente zu bestätigen, war die Veranlassung zur Ausführung unserer Versuche.

Beschreibung der Versuche.

Die Aufgabe unserer Versuche besteht darin, den Nutzeffekt eines aus Timothee und Klee bestehenden Heus im Zusammenhange mit der Umgebungstemperatur und dem Ernährungszustande des Tieres zu bestimmen. Die Versuche wurden mit Kaninchen ausgeführt, die in besonders eingerichtete, mit zwei Netzböden versehene Zinkkäfige gesetzt wurden. Der obere Boden war aus seltenem Drahtnetze mit großen Öffnungen verfertigt, durch welche die Exkremente frei passieren konnten, um vom unteren Netze mit feinen Öffnungen aufgehalten zu werden; der Harn passierte beide Netze und gelangte durch den unteren trichterförmigen Teil des Käfigs in ein Gläschen, das eine kleine Menge 2%iger H_2SO_4 enthielt.

Es wurden im ganzen drei Versuchsserien mit 4 Kaninchen ausgeführt. Jeder Versuch der zwei ersten Serien bestand aus zwei Perioden, die je 8 bis 10 Tage dauerten; in der einen bestand die Ration aus Erbsen, Hafer und Heu, in der anderen wurde eine große Menge fein gehäckselten Heus hinzugefügt. Das Gemenge wurde mit einer bestimmten Menge heißen Wassers begossen und in dieser Gestalt den Tieren verabreicht. In den beiden Perioden eines jeden Versuchs wurde der Umsatz des Kohlenstoffs, des Stickstoffs und der Energie bestimmt; aus der Betrachtung der Bilanzen konnte man die Größe des Nutzeffekts des beigefügten Heus bestimmen. Zur Untersuchung der Gasausschei-

dung wurden die Kaninchen 2 oder 3mal während einer Periode auf 24 Stunden in Prof. Paschutins Respirationsapparat gestellt.

Für Versuche bei 0° C bedienten wir uns einer besonderen Kühlvorrichtung, welche die Form eines großen hölzernen Kastens hatte, der von außen mit Filz beschlagen, von innen mit Zink bedeckt war. Der Kasten wurde mit einem Deckel zugemacht. In der Mitte des Deckels befand sich ein großes Glas, um Licht durchzulassen; an den Seiten des Kastens waren zwei Öffnungen für Ventilationsröhren. In diesem Kasten befand sich ein zweiter Kasten aus Zink mit einem Glasdeckel; in den zweiten Kasten wurde der Käfig mit dem Kaninchen oder bei Untersuchung des Gaswechsels der Respirationsapparat gestellt. Der Raum zwischen beiden Kasten wurde mit Eis und Kochsalz gefüllt. Die Temperatur wurde mittels eines im Käfig oder im Respirationsapparat befindlichen Thermometers gemessen. Bei Versuchen mit einer Temperatur von 30° C wurde der innere Zinkkasten herausgenommen, auf besondere Ständer gestellt und mittels einer Gaslampe von unten erhitzt. Die Temperaturschwankungen betrugen wie in den Versuchen bei 0° C, so auch in den Versuchen bei 30° C, nicht mehr als 2 bis 4°. Alle analytischen Untersuchungen wurden, nur sehr wenige Fälle ausgenommen, doppelt ausgeführt. Die Harnanalyse zur Bestimmung des Stickstoffs wurde täglich ausgeführt, der Kohlenstoffgehalt wurde aber in einer Mittelprobe des in 2 oder 3 Tagen erhaltenen Harns mittels Oxydation durch H_2SO_4 und Kaliumbichromat bestimmt. Aus demselben Harn wurden Proben von je 10 bis 20 ccm zur Bestimmung des Wärmewertes genommen. Zu diesem Zwecke wurde der Harn in kleine Schälchen gegossen, worin Cellulose-Absorptionsblöckchen gelegt und über H_2SO_4 bei geringem Drucke getrocknet wurden. Die calorimetrischen Untersuchungen des Harns, wie auch der Futtermittel und der Exkremente wurde mittels der Petersschen Bombe in Sauerstoffgas von 25 Atmosphären Druck bewerkstelligt.

Die III. Versuchsserie wurde mit einem hungernden Kaninchen ausgeführt, das nach dreitägigem Hungern im Laufe von 3 Tagen 50 g Heu täglich erhielten.

Nach diesen allgemeinen Bemerkungen können wir nun zu einer ausführlichen Schilderung unserer Versuche übergehen.

I. Versuchsserie.[1])

Diese Serie bestand aus drei Versuchen, die mit einem Kaninchen A ausgeführt wurden. Versuch I fand bei 20° C, II bei 0° C und III bei

[1]) Diese Versuche wie auch die mit dem hungernden Kaninchen sind von G. W. Bogajewski unter persönlicher Beobachtung von Ustjanzew angestellt, derselbe hat auch alle hierzu gehörenden analytischen Bestimmungen ausgeführt; von Ustjanzew sind nur die Elementaranalysen und die calorimetrischen Untersuchungen ausgeführt.

30° C statt. Während dieser Versuche, die nacheinander mit einigen Zeiträumen folgten, bekam das Kaninchen ein und dieselbe Ration, nämlich in der I. Periode 10 g Erbsen, 10 g Hafer und 10 g Heu, in der II. Periode wurden diesem Futter 40 g Heu zugefügt. Das Futter wurde stets am Morgen zwischen 9 und 10 Uhr im Käfig oder im Respirationsapparat verabreicht und vom Tiere ohne Überbleibsel verzehrt. Die Protokolltabellen dieser Versuche sind in der Beilage angeführt (siehe Tabelle I).

Da die Exkremente nach Perioden nicht geschieden wurden, so schwankte natürlich ihre Menge in verschiedenen Versuchen. Diese Schwankungen waren jedoch sehr unbedeutend und weisen infolge der möglichen Fehler, die durch ungleichmäßige Ausscheidung und Aufsammlung der Exkremente veranlaßt sind, unzweifelhaft einen zufälligen Charakter auf. Es ist anzunehmen, daß die Verdaulichkeit des Futters in allen Versuchen unabhängig von der Umgebungstemperatur ein und dieselbe blieb. Damit die Unterschiede in den Mengen der Exkremente auf die Berechnung der Bilanz des Stoff- und Energiewechsels keinen Einfluß ausüben könnten, haben wir für die Menge, so auch für den chemischen Bestand und den Wärmewert der Exkremente mittlere Größen angenommen. Die Menge und der chemische Bestand der Exkremente und die festgestellten mittleren Werte sind in folgender Tabelle angegeben.

		I. Versuch		II. Versuch		III. Versuch		Durchschnitt	
		Periode		Periode		Periode		Periode	
		I	II	I	II	I	II	I	II
Menge	lufttr. Subst.	10,1	38,8	9,5	39,0	9,3	38,7	—	—
	trock. Subst.	9,2	34,8	8,6	35,8	8,3	35,4	8,7	35,3
Stickstoff	%	1,37	1,40	1,35	1,45	1,40	1,35	—	—
	g	0,126	0,487	0,116	0,519	0,116	0,478	0,119	0,495
Kohlenstoff	%	45,85	45,80	45,97	46,15	46,00	46,16	—	—
	g	4,218	15,938	3,953	16,521	3,818	16,341	3,996	16,266
Energie-Inh.	1 g cal.	4446,8	4480,4	4440,3	4465,0	4384,6	4459,5	4423,9	4468,3
	Cal.	40,91	155,92	38,19	159,85	36,39	159,87	38,48	157,80

Der Gehalt an organischer Substanz, Stickstoff, Kohlenstoff und der Wärmewert der Futtermittel, bezogen auf die Trockensubstanz, war folgender:

	Trockensubst. %	Organ. Subst. %	Stickstoff %	Kohlenstoff %	Energie-Inhalt 1 g
Erbsen . . .	89,87	96,94	4,32	44,58	4424,2 cal.
Hafer . . .	89,50	96,05	2,20	46,77	4626,8 „
Heu	89,89	93,25	1,26	45,25	4422,6 „

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse des Stickstoff- und Kohlenstoffwechsels für einen Tag nach Perioden in jedem Versuche angeführt.

Ergebnisse des Stick- und Kohlenstoffwechsels.

	Aufnahme g		Abgabe g						
	Stickstoff	Kohlenstoff	Stickstoff			Kohlenstoff			
			im Harn	im Kot	Summe beider	in der Respiration	im Harn	im Kot	Gesamt C-Ausscheid.
I. Versuch. T. 20° C.									
I. Periode	Erbsen 0,388, Hafer 0,197, Heu 0,113 } 0,698	4,006, 4,096, 4,067 } 12,169	0,857	0,119	**0,976**	8,400	0,606	3,996	**13,002**
II. Periode	+40 g Heu 0,453 = 1,151	+16,267 = 28,436	0,672	0,495	**1,167**	10,360	0,808	16.266	**27,434**
II. Versuch. T. 0° C.									
I. Periode	0,698	12,169	1,437	0,119	**1,556**	10,640	1,125	3,996	**15,761**
II. Periode	1,151	28,436	1,211	0,495	**1,706**	11,400	1,289	16,266	**28,955**
III. Versuch. T. 30° C.									
I. Periode	0,698	12,169	0,597	0,119	**0,716**	8,310	0,484	3,996	**12,790**
II. Periode	1,151	28,436	0,586	0,495	1,081	10,690	0,746	16,266	**27,702**

Gewinn oder Verlust an Protein und Fett.

Auf Grund der Zahlen der soeben angeführten Tabelle können wir die Stick- und Kohlenstoffbilanzen, wie auch die denselben entsprechenden Eiweiß- und Fettmengen berechnen, die sich im Körper abgelagert haben oder zerfallen sind. Nach Köhlers Angaben beträgt der Stickstoffgehalt im Eiweiß (Fleisch) 16,67 %, der Gehalt an Kohlenstoff 52,54 %. Deshalb haben wir zur Berechnung der Eiweißmenge nach Stickstoff den Koeffizient 6,0, aber zur Bestimmung des Fettes nach Kohlenstoff den gewöhnlichen Koeffizient 1,3 benutzt. Für den Wärmewert eines Gramms Eiweiß und Fett wurden die Faktoren 5,7 Cal. und 9,5 Cal. angewandt.

Gewinn oder Verlust von Eiweiß und Fett pro Tag.

	Gewinn an Stickstoff g	Entsprechendes Eiweiß $N \times 6,0$ g	Gewinn an Kohlenstoff		Entsprechendes Fett $C \times 1,3$ g	Gewinn an Eiweiß und Fett in Cal. pro Tag
			Insgesamt g	Eiweiß C abgezogen — Als Fett g		
I. Versuch. 20° C.						
I. Periode	— 0,278	— **1,668**	— 0,833	+ 0,043	+ **0,06**	— **10,07**
II. „	— 0,016	— **0,096**	+ 1,002	+ 0,952	+ **1,24**	+ **11,28**
II. Versuch. 0° C.						
I. Periode	— 0,858	— **5,148**	— 3,592	— 0,887	— **1,15**	— **40,26**
II. „	— 0,555	— **3,330**	— 0,519	+ 1,230	+ **1,60**	— **3,78**
III. Versuch. 30° C.						
I. Periode	— 0,018	— **0,108**	— 0,621	— 0,564	— **0,733**	— **7,57**
II. „	+ 0,070	+ **0,420**	+ 0,734	+ 0,513	+ **0,667**	+ **8,73**

Hieraus ersehen wir, daß in der I. Periode aller Versuche sich ein bald größerer, bald kleinerer Eiweiß- und Fettverlust aus dem Körper im Zusammenhange mit der Temperatur beobachten läßt. Die Futterration war in der I. Periode aller Versuche zur Deckung der Bedürfnisse des Kaninchens ungenügend. Dank dem Umstande, daß die Ration des Tieres in allen Versuchen ein und dieselbe blieb, konnte man natürlich erwarten, daß die Ernährung des Kaninchens je nach der Umgebungstemperatur sich verschieden gestalten würde. In der Tat, während bei 20° der Verlust der Körpergewebe 10,07 Cal. betrug, erreichte er bei 0° schon 40,26 Cal. Die Zugabe von 40 g Heu zur Ration bewirkte in allen Versuchen eine merkliche Eiweiß- und Fettersparnis im Körper.

Energiebilanz.

Zur Feststellung der Energiebilanz haben wir unmittelbar den Wärmewert des Futters, der Exkremente und des Harns mittels Verbrennung in der Bombe bestimmt. Für die Exkremente haben wir mittlere Größen benutzt, die aus den Ergebnissen für die I. und II. Periode in jedem Versuche erhalten worden sind. Der Gehalt der Energie im Harn wurde, wie gewöhnlich, einmal im Laufe einer Periode bestimmt; dabei wurde das Verhältnis zum Kohlenstoff ermittelt, und nach der Menge des letzteren wurde der Wärmewert des Harns pro 1 Tag in jeder Periode bestimmt. Indem wir die Energie, welche der Organismus im Futter erhält, und auch diejenige, welche aus dem Organismus als Körpereiweiß und Fett schwindet, mit der Menge der Energie vergleichen, die durch Exkremente ausgeschieden und im Körper als Eiweiß und Fett abgesetzt wird, erhalten wir eine Differenz, die der ausgeschiedenen tierischen Wärme entspricht. Es ist selbstverständlich, daß die gefundenen Werte für die Wärmeproduktion von den wirklichen etwas abweichen müssen, da 1. in den Berechnungen des Verlustes oder der Ablagerung des Eiweißes und des Fettes im Körper stets einige Ungenauigkeiten infolge der Methotik der Stoffwechselforschung möglich sind, und da wir 2. die Energie nicht bestimmt haben, die das Tier im Methan verlor. Dennoch gewähren diese Ergebnisse einiges Interesse, da sie unmittelbar zeigen, auf welchem Wege

Energiebilanz.

	Aufnahme Cal.		Abgabe Cal.			Berechnete Wärmeproduktion Cal.
	in der Nahrung	Verlust des Körpers an Eiweiß und Fett	Faeces	Harn	Ansatz im Körper an Eiweiß und Fett	
I. Versuch. I. Periode	120,95	10,07	38,48	6,12	—	86,42
II. „	280,08	—	157,80	5,66	11,23	105,39
II. Versuch. I. Periode	120,95	40,26	38,48	12,15	—	110,58
II. „	280,08	3,78	157,80	10,57	—	115,49
III. Versuch. I. Periode	120,95	7,57	38,48	4,50	—	85,54
II. „	280,08	—	157,80	5,44	8,73	108,11

die Wärmeregulation bei Verfütterung des Heus unter verschiedenen Umgebungstemperaturen stattfand.

Aus den Daten der Wärmeproduktion geht es hervor, daß unter dem Einflusse der Zugabe des Heues in allen Versuchen eine Steigerung der Wärmeausscheidung eintrat, die aber je nach der Umgebungstemperatur bald größer, bald kleiner war. Während bei 20° die Wärmeproduktion sich um 18,97 Cal., bei 30° sogar um 22,57 Cal. steigerte, betrug die Steigerung bei 0° nur 4,91 Cal.

Physiologischer Nutzwert des Heus.

Auf Grund der Zahlen der angeführten Tabellen können wir jetzt den physiologischen Nutzwert des Heues bestimmen. Wir wiederholen hierbei, daß wir die Menge des Methans nicht festgestellt haben, und daher ist die Größe des von uns ermittelten physiologischen Nutzeffekts etwas höher als in Wirklichkeit. Zur Berechnung der umsetzbaren Energie des Futters haben wir aus seiner Gesamtenergie die in den Exkrementen und in dem Harn enthaltene Energie abgezogen. Da in allen Versuchen das Kaninchen etwas mehr Protein zersetzte, als es im Futter bekam, so muß ein Teil der Energie im Harn, die Energie des zersetzten Körpereiweißes vorstellen, und dieser Teil muß aus der Gesamtenergie des Harns abgezogen werden. Nach Rubners Angaben steigerte sich die potentiale Energie des Harns um 7,45 Cal. bei jedem Gramm Stickstoff, der durch die Oxydation des Körperstickstoffes entsteht. Z. B. da in der I. Periode des I. Versuches das Kaninchen 0,278 g Körperstickstoff verlor, so stammen 2,07 Cal. im Harn nicht aus der Energie des Futters, sondern aus den Körpergeweben her, und diese Größe müssen wir also aus dem Wärmewert des Harns abziehen.

	Futter Cal.	Exkrete Cal.		Physiologischer Nutzwert der Gesamtration Cal.	
		Kot	Harn (korrigiert)		
I. Versuch.					
I. Periode	120,95	38,48	(6,12—2,07) = 4,05	78,42	
II. „	280,08	157,80	(5,66—0,12) = 5,54	116,74	
II. Versuch.					
I. Periode	120,95	38,48	(12,15—6,39) = 5,76	76,71	
II. „	280,08	157,80	(10,57—4,13) = 6,44	115,84	
III. Versuch.					
I. Periode	120,95	38,48	(4,50—0,13) = 4,37	78,10	
II. „	280,08	157,80	(5,44+0,52) = 5,96	116,32	
Durchschnitt.					
I. Periode	120,95	38,48	4,72	77,74	64,30%
II. „	280,08	157,80	5,98	116,30	41,52%
Heu 35,9 g Trockensubst.	159,13	119,32	1,24	38,56	24,22%

In den drei unteren Reihen der Tabelle haben wir mittlere Größen des physiologischen Nutzeffekts des Futters für jede Periode genommen und sein Prozentverhältnis zur Gesamtenergie des Futters berechnet. Wenn wir die Zahlen beider Perioden miteinander vergleichen, so finden wir die Größe der umsetzbaren Energie des hinzugefügten Heues. Die Tabelle zeigt uns, daß der physiologische Nutzwert des Heues 38,56 Cal. gleicht, was 24,22% der gesamten chemischen Energie beträgt. Aus der folgenden Tabelle, in welcher der Nutzeffekt des Heues angeführt wird, ersehen wir, daß die Menge der verdaulichen organischen Substanz in hinzugefügtem Heu 9,05 g betrug.[1]) Folglich sind enthalten in 1 g der verdaulichen organischen Substanz des Heues 4260,7 Cal. der physiologisch nützlichen Energie.

Reine nutzbare Energie des Heues.

Wir wollen nun die Größe der nutzbaren Energie des Heues in den verschiedenen Versuchen betrachten; das ist die Energie, welche die Energie der Gewebe unmittelbar vertreten und den Körper vor Eiweiß- und Fettzerfall bewahren kann. Es fällt schon bei Betrachtung der Protokolltabellen (Beilage) ein merklicher Unterschied in der Ausscheidung des CO_2 bei der Atmung in den verschiedenen Versuchen unwillkürlich in die Augen; dies wird durch die Zugabe von Heu bewirkt. So stieg in dem Versuche bei 20° die Menge der ausgeatmeten CO_2 infolge der Zugabe des Heues von 30,8 bis 38,0 g, d. h um 7,2 g oder um 23%, in dem Versuche bei 0° aber — von 39,0 bis 41,8 g, d. h. im ganzen um 2,8 g oder um ungefähr 7%. Wir können schon aus diesen Zahlen schließen, daß der Prozeß der Wärmeregulation im Zusammenhange mit verschiedenen Ernährungsbedingungen des Kaninchens recht ungleichmäßig verläuft. Eine so geringe Zunahme der Ausscheidung des CO_2 bei 0° infolge der Zugabe des Heues kann wohl bis zu einem gewissen Grade von der bedeutenden Abnahme des Lebendgewichts des Kaninchens in der II. Periode abhängen. Aber dies geschah nur bis zu einem gewissen Grade, denn diese Erscheinung, d. h. eine weit geringere Zunahme der ausgeschiedenen CO_2 infolge der Zugabe des Heues bei niedriger Temperatur im Vergleich mit der Zunahme bei einer hohen Temperatur, läßt sich in allen Versuchen beobachten, wie wir dies weiter unten sehen werden. Ferner konnten wir aus der Energiebilanz wahrnehmen, daß bei 0° die Wärmeproduktion infolge des zugefügten Heues nur recht unbedeutend zunahm, wenn man sie mit der Wärmeproduktion in den Versuchen bei hoher Temperatur vergleicht. Alles dies weist schon im voraus darauf hin, daß der Verwertungskoeffizient der umsetzbaren Energie des Heues in verschiedenen Versuchen recht verschieden war.

Den Nutzeffekt des hinzugefügten Heues drückt die Energie der-

[1]) Der prozentische Gehalt der Exkremente an organischer Substanz war im Durchschnitt von 3 Versuchen für jede Periode ein folgender: I. Periode 91,80%, II. Periode 91,95%.

jenigen Fleisch- und Fettmengen aus, die das Heu im Körper des Tieres erspart hat.

Zur Bestimmung dieser nutzbaren Energie ändern wir die Energie des Verlustes oder der Zunahme im Körper des Fleisches und des Fettes um dieselbe Größe, wie bei der Berechnung des physiologischen Nutzeffekts, indem man 7,45 Cal. auf jedes Gramm Stickstoff im Harn abzieht, da der Betrag an umsetzbarer Energie in derselben Weise korrigiert worden ist.[1])

Folgende Tabelle zeigt uns die Größe der nutzbaren Energie des Heues.

	Verdaute organische Substanz in den Rationen g	Mittlere umsetzbare Energie des Futters Cal.	Gesamtgewinn oder Verlust (korrigiert) vom Futter Cal.	Nutzbarkeit %
I. Versuch. 20° C.				
I. Periode	17,71	77,74	(— 10,07 — 2,07) = — 8,00	
II. „	26,76	116,30	(+ 11,23 — 0,12) = + 11,11	
Heu	9,05	38,56	19,11	49,6
II. Versuch. 0° C.				
I. Periode	17,71	77,74	(— 40,26 — 6,39) = — 33,87	
II. „	26,76	116,30	(— 3,78 — 4,13) = + 0,35	
Heu	9,05	38,56	34,22	88,7
III. Versuch. 30° C,				
I. Periode	17,71	77,74	(— 7,57 — 0,13) = — 7,44	
II. „	26,76	116,30	(+ 8,73 + 0,52) = + 9,25	
Heu	9,05	38,56	16,69	43,3

Aus dieser Tabelle ersehen wir, daß der Nutzeffekt des Heues im Zusammenhange mit diesen oder jenen Bedingungen des Versuches recht bedeutend schwankt. Es stellt sich heraus, daß bei Verabreichung ein und derselben Ration der Koeffizient der Nutzwirkung oder der „Produktionswert" des Heues in strenger Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur steht. Wir sehen, daß in dem Versuche bei 30° C die Nutzbarkeit des physiologischen Nutzwertes des Heues im ganzen 43,3% beträgt, bei 20% schon 49,6%, bei 0° erreicht sie 88,7%, d. h. fast die gesamte umsetzbare Energie des Rauhfutters wird von dem Tiere zur Ersetzung der Bestandteile des Körpers ausgenutzt. Hieraus folgt, daß bei gewissen Ernährungsbedingungen des Tieres die Verwertung

[1]) Diese Methode wandte H. Armsby in seinen Bestimmungen an (Landw. Jahrb. 33).

des physiologischen Nutzwertes fast in voller Übereinstimmung mit dem Gesetze der isodynamen Vertretung stattfindet. Es fragt sich nun, welches die Bedingungen sind, bei denen der physiologische Nutzwert als Maßstab des Nährwertes des Rauhfutters dienen kann?

Bei einer näheren Betrachtung der angeführten Versuche müssen wir unsere Aufmerksamkeit auf den Umstand lenken, daß außer der Umgebungstemperatur die Bedingungen des Versuchs noch einen recht wesentlichen Faktor aufweisen — dies ist der Unterschied in der Ernährung des Tieres. Da die Ration des Tieres in allen Versuchen ein und dieselbe war, so ist es verständlich, daß je nach dieser oder jener äußeren Temperatur der Ernährungszustand des Kaninchens wesentlich verschieden ist, da die Intensivität des Stoffwechsels sich in strenger Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur befindet. Unsere Versuche zeigen in der Tat, daß die Größe des Verbrauches der Nährstoffe und auch der Verlust an Eiweiß und Fett aus dem Körper in der I. Periode bei 0° und bei 30° sehr verschieden ist. Während im Versuche bei 0° die Energie des Verlustes von Eiweiß und Fett aus dem Körper 40,26 Cal. betrug, war sie bei 30° 7,57 Cal. Wenn wir auf Grund der Daten des Stick- und Kohlenstoffumlaufes in beiden Fällen die Größen des Verbrauches der Nährstoffe oder das Bedürfnis des Tieres im Nahrungsmaterial berechnen und ihr Verhältnis zum Quantum des im Futter verabreichten physiologischen Nutzwertes ermitteln, so sehen wir ganz deutlich, daß die Bedingungen der Aufnahme des Rauhfutters, unabhängig von der Umgebungstemperatur, wesentlich verschieden waren. In der Tat, das Bedürfnis des Kaninchens in der Nahrung betrug in der I. Periode im Versuche bei 0° 138,47 Cal.[1]), bei 30° C 105,80 Cal.; die Menge der umsetzbaren Energie im Futter glich in der II. Periode der Versuche 116,30 Cal. Wenn wir das Verhältnis der im Futter aufgenommenen Energie zum Bedürfnisse des Tieres feststellen, indem wir das letztere als 100 annehmen, so erhalten wir im ersten Falle 84%, im zweiten 110%. In dem Versuche bei 0° war die Menge der im Futter verabreichten physiologischen nutzbaren Energie geringer als der Bedarf des Tieres, aber im Versuche bei 30° war diese Menge etwas größer als der Bedarf. Es fragt sich hier unwillkürlich, ob nicht neben der Umgebungstemperatur der Unterschied in den Ernährungsbedingungen des Tieres eine ungleiche Verwertung der Energie des Rauhfutters bewirken könnte. Um diese Frage aufzuklären, haben wir eine zweite Versuchsserie nach demselben Plane aufgestellt, nur mit dem Unterschiede im Vergleich zur ersten Serie, daß die Kaninchen verschiedenes Futter erhielten, das mehr oder minder reichlich war und mit der Absicht verabreicht wurde, damit die Ernährung der Kaninchen in

---

[1]) Die Dimension des Verbrauches der Nährstoffe wurde von uns auf Grund des Stickstoffgehaltes im Harn und des im Harn und bei der Atmung ausgeschiedenen Kohlenstoffs bestimmt, wobei für die Umrechnung auf Eiweiß und Fett, wie auch für die Ermittelung der calorimetrischen Werte die schon angeführten Koeffiziente verwandt wurden.

vergleichenden Versuchen bei verschiedenen Temperaturen möglichst ein und dieselbe bliebe. Hierdurch wollten wir erreichen, daß sich die nützliche Wirkung der Heuzugabe nur unter dem Einflusse verschiedener Umgebungstemperatur befände.

II. Versuchsserie.

Für die Versuchsserie wurden zwei Kaninchen C und D verwandt, wobei mit jedem von ihnen zwei Versuche — bei 0° C und bei 30° C. — ausgeführt wurden. Dem Kaninchen C wurde in der I. Periode des Versuchs bei 30° C dieselbe Ration verabreicht wie in der ersten Versuchsserie, nämlich 10 g Erbsen, 10 g Hafer und 10 g Heu, aber in dem Versuche bei 0° wurde die Menge der Erbsen der Ration bis auf 20 g erhöht. Das Kaninchen D erhielt im Gegenteil während des Versuches bei 0° die Ration der I. Serie, bei 30° wurde ihm nur 10 g Heu verabreicht. In diesen Rationen wurde in der II. Periode in allen Versuchen, wie auch früher, je 40 g desselben Heues hinzugefügt. Somit gedachten wir, zwei Versuchsreihen zu erhalten, wobei in der ersten Reihe das Kaninchen ein dem Erhaltungsfutter sehr nahes Nahrungsquantum erhielt, in der zweiten aber ihm ein sehr kärgliches Futter gegeben wurde. Wir vermuteten, daß bei verschiedenen Rationen der Ernährungszustand des Kaninchens wie bei niedriger, so auch bei hoher Temperatur ungefähr der gleiche bleiben werde.

Die Protokolltabellen dieser Versuchsserie sind in der Beilage angeführt (siehe Tabelle II u. III).

Der chemische Bestand der Futtermittel ist schon oben angegeben (siehe S. 116).

Die Menge und der chemische Bestand, wie auch der Wärmewert der Exkremente, die in verschiedenen Perioden beider Versuchsreihen erhalten worden sind, waren folgende:

Kaninchen C.	Trocken-Substanz-Menge	Organische Substanz in der Trockensubstanz	Stickstoff in der Trockensubstanz	Kohlenstoff in der Trockensubstanz	Energie-Inhalt in g
I. Versuch. 0° C.					
I. Periode . . .	8,24 g	91,43 %	1,22 %	47,13 %	4385,4 cal.
II. „ . . .	33,63 „	91,35 „	1,40 „	45,95 „	4405,0 „
II. Versuch. 30° C.					
I. Periode . . .	8,18 „	91,14 „	1,28 „	45,35 „	4389,5 „
II. „ . . .	34,16 „	91,90 „	1,40 „	45,95 „	4420,0 „
Kaninchen D.					
I. Versuch. 0° C.					
I. Periode . . .	8,29 „	91,95 „	1,05 „	45,90 „	4396,2 „
II. „ . . .	34,31 „	91,56 „	1,22 „	45,14 „	4457,4 „
II. Versuch. 30° C.					
I. Periode . . .	4,95 „	91,40 „	1,48 „	45,52 „	4434,7 „
II. „ . . .	29,11 „	91,48 „	1,35 „	46,56 „	4478,5 „

In einer Reihe folgenden Tabellen sind die Zahlen des Stickstoff- und Kohlenstoffumlaufes, die Mengen des Fleisches und Fettes, die zersetzt oder im Körper des Tieres abgesetzt sind und endlich die Ergebnisse des Energieumsatzes angeführt. Alle diese Zahlen sind auf dieselbe Weise ermittelt worden, wie in der ersten Versuchsserie.

Einnahme und Abgabe von Stickstoff und Kohlenstoff pro Tag.

	Aufnahme		Abgabe						
	Stick-stoff	Kohlen-stoff	Stickstoff in g			Kohlenstoff in g			
	g	g	im Harn	im Faeces	Summe beider	in der Respi-ration	im Harn	im Kot	Gesamt-C-Aus-scheidung
			Kaninchen C. I. Versuch. 0° C.						
I. Periode	1,086	16,175	1,450	0,100	1,550	14,170	0,971	3,883	19,024
I. „	1,539	32,442	1,326	0,471	1,797	15,710	1,401	15,453	32,564
			II. Versuch. 30° C.						
I. Periode	0,698	12,169	0,744	0,105	0,849	8,838	0,687	3,709	13,234
II. „	1,151	28,436	0,749	0,478	1,227	11,045	0,969	15,696	27,710
			Kaninchen D. I. Versuch. 0° C.						
I. Periode	0,698	12,169	1,628	0,087	1,715	11,640	1,033	3,805	16,478
II. „	1,151	28,436	1,143	0,418	1,561	13,090	1,236	15,487	29,813
			II. Versuch. 30° C.						
I. Periode	0,113	4,067	0,563	0,073	0,636	5,454	0,565	2,255	8,274
II. „	0,566	20,334	0,469	0,393	0,862	7,250	0,910	13,559	21,719

Gewinn oder Verlust von Eiweiß und Fett pro Tag.

	Gewinn an Stickstoff	Ent-sprechen-des Eiweiß $N \times 6,0$	Gewinn an Kohlenstoff		Ent-sprechen-des Fett $C \times 1,3$	Gewinn an Eiweiß und Fett in Cal.
			Insgesamt	Eiweiß C abgezogen Als Fett		
	g	g	g	g	g	
			Kaninchen C. I. Versuch. 0° C.			
I. Periode	— 0,464	— 2,784	— 2,849	— 1,386	— 1,80	— 32,97
II. „	— 0,258	— 1,548	— 0,122	+ 0,691	+ 0,90	— 0,27
			II. Versuch. 30° C.			
I. Periode	— 0,151	— 0,906	— 1,065	— 0,589	— 0,76	— 12,38
II. „	— 0,076	— 0,456	+ 0,726	+ 0,487	+ 0,63	+ 3,38
			Kaninchen D. I. Versuch. 0° C.			
I. Periode	— 1,017	— 6,102	— 4,309	— 1,103	— 1,43	— 48,36
II. „	— 0,410	— 2,460	— 1,377	— 0,085	— 0,11	— 15,04
			II. Versuch. 30° C.			
I. Periode	— 0,523	— 3,138	— 4,207	— 2,559	— 3,32	— 49,42
II. „	— 0,296	— 1,776	— 1,385	— 0,452	—0,59	— 15,72

Energiebilanz.

	Aufnahme Cal.		Abgabe Cal.			Berechnete Wärme-produktion
	in der Nahrung	Verlust des Körpers an Eiweiß u. Fett	Faeces	Harn	Ansatz im Körper an Eiweiß u. Fett	Cal.
Kaninchen C.						
I. Versuch. I. Periode . . .	160,71	32,97	36,13	10,48	—	147,07
II. „ . . .	319,84	0,27	148,14	12,19	—	159,78
II. Versuch. I. „ . . .	120,95	12,38	35,91	6,39	—	91,03
II. „ . . .	280,08	—	150,99	8,04	3,38	117,67
Kaninchen D.						
I. Versuch. I. Periode . . .	120,95	48,36	36,44	12,19	—	120,68
II. „ . . .	280,08	15,04	152,93	10,75	—	131,44
II. Versuch. I. „ . . .	39,75	49,42	21,95	4,56	—	62,66
II. „ . . .	198,88	15,72	130,37	6,46	—	77,77

Physiologischer Nutzwert und reine nutzbare Energie des Heues.

Bei Berechnung des physiologischen Nutzwertes des Futters verfuhren wir mit der Energie im Harn ebenso wie in der I. Versuchsserie, indem wir die Menge des Stickstoffs in Betracht zogen, der aus dem Körper ausgeschieden oder in demselben abgesetzt wird, und für jedes Gramm desselben den Faktor 7,45 Cal. annahmen. Dieselbe Korrektion nahmen wir mit der Energie des im Körper abgesetzten oder zerfallenen Fleisches und Fettes vor. Indem wir die Zahlen der I. und II. Periode in jedem Versuche vergleichen, erhalten wir die Größe des physiologischen Nutzwertes und den Produktionswert des hinzugefügten Heues. Alle diese Daten sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Der physiologische Nutzwert und reine nutzbare Energie des Heues.

	Gesamtenergie des Futters Cal.	Exkrete Cal.		Umsetzbare Energie Cal.	Nutzbarkeit	
		Kot	Korrigierte Energie des Harn		Gesamtgewinn (vom Futter) oder Verlust (korrigiert) Cal.	%
Kaninchen C. I. Versuch. 0° C.						
I. Periode . .	160,71	36,13	(10,48 — 3,46) = 7,02	117,56	(—32,97—3,46) = —29,51	
II. „ . .	319,84	148,14	(12,19 — 1,92) = 10,27	161,43	(—0,27—1,92) = + 1,65	
Heu (Differenz)	159,13	112,01	3,25	43,87	31,16	71,00

	Gesamtenergie des Futters Cal.	Exkrete Cal.		Umsetzbare Energie Cal.	Nutzbarkeit	
		Kot	Korrigierte Energie des Harn		Gesamtgewinn (vom Futter) oder Verlust (korrigiert) Cal.	%
II. Versuch. 30° C.						
I. Periode . .	120,95	35,91	(6,39—1,12) = 5,27	79,77	(−12,38−1,12) = — 11,26	
II. „ . .	280,08	150,99	(8,04—0,57) = 7,47	121,62	(+3,38 − 0,57) = + 2,81	
Heu (Differenz)	159,13	115,08	2,20	41,85	14,07	33,62
Kaninchen D. I. Versuch. 0° C.						
I. Periode . .	120,95	36,44	(12,19—7,57) = 4,62	79,89	(−48,36−7,57) = — 40,79	
II. „ . .	280,08	152,93	(10,75 − 3,05) = 7,70	119,45	(−15,04−3,05) = — 11,97	
Heu (Differenz)	159,13	116,49	3,08	39,56	28,82	72,85
II. Versuch. 30° C.						
I. Periode . .	39,75	21,95	(4,56—3,94) = 0,62	17,18	(−49,42 3,94) = — 45,48	
II. „ . .	198,88	130,37	(6,46—2,20) = 4,26	64,25	(−15,72 − 2,20) = — 13,52	
Heu (Differenz)	159,13	108,42	3,64	47,07	31,96	67,80

Bei Betrachtung dieser Versuchsserie müssen wir vor allem konstatieren, daß unsere Absicht, solche Rationen zusammenzustellen, bei denen die Ernährung des Kaninchens bei 0° und 30° C in der I. Periode die gleiche bleiben würde, in der I. Reihe bei weitem zu keinem erwünschten Resultate geführt hat. Die Steigerung der täglichen Ration bei 0° um 10 g Erbsen erwies sich als zu ungenügend, um die Verluste des Organismus zu bedecken, die mit einer niedrigeren Temperatur verbunden sind. Aus der Tabelle des Verlustes und der Ablagerung des Fleisches und des Fettes im Körper ersehen wir, daß trotz der angeführten Zugabe zur Ration die Ernährung des Kaninchens in den Versuchen bei 0° und bei 30° sich ganz verschieden gestaltet; der Verlust an Eiweiß und an Fett aus dem Körper betrug nämlich im ersten Falle 32,97 Cal., im zweiten 12,38 Cal. Wenn wir nach Analogie der ersten Versuchsserie auf Grund der Zahlen des Stick- und Kohlenstoffumsatzes das Bedürfnis des Kaninchens in der I. Periode der Versuche bei 0° und bei 30° berechnen, so erhalten wir folgende Größen: in dem Versuche bei 0° 180,1 Cal., bei 30° C 104,1 Cal. Die Menge der umsetzbaren Energie beträgt indessen in der Ration der II. Periode im ersten Versuche 161,43 Cal., im zweiten 121,62 Cal., d. h. sie glich in einem Falle 90%, im anderen 117% des gesamten Bedürfnisses des Tieres in Nährstoffen. Somit erweisen sich diese Versuche eher als eine Wiederholung der früheren Versuchsserie mit dem Kaninchen A, denn die Verwertung des physiologischen Nutzwertes des Heues

befindet sich hier auch unter dem Einflusse der äußeren Temperatur und des Ernährungszustandes des Tieres.

Nur die Versuche mit dem Kaninchen D geben uns die Möglichkeit, über den Einfluß der Umgebungstemperatur auf den Verwertungskoeffizient der Energie des Heues zu urteilen. In dieser Versuchsreihe ist es dank dem Unterschiede in der Ration gelungen, bei 0° und bei 30° eine fast gleiche Ernährung des Kaninchens zu erreichen. Dieselbe Tabelle zeigt, daß der Verlust des Eiweißes und des Fettes aus dem Körper in der I. Periode des Versuches bei 0° 48,36 Cal., bei 30° C 49,42 Cal. gleich ist. Das Bedürfnis des Kaninchens im Futter betrug im ersten Falle 148,80 Cal., im zweiten 71,66 Cal. Der physiologische Nutzwert glich indessen in der II. Periode bei 0° 119,45 Cal., bei 30° C 64,25 Cal. und betrug folglich im ersten Versuche 80%, im zweiten 89% des gesamten Bedürfnisses des Tieres. Die Zugabe von 40 g Heu zur Ration wurde hier unter der Bedingung der ungefähr gleichen Ernährung des Tieres verabreicht, und der Unterschied in Nutzwirkung des Heues stände, wenn er sich geäußert hätte, gänzlich unter dem Einflusse der ungleichen Umgebungstemperatur.

Wie es aus der letzten Tabelle folgt, zeigen die Resultate der Versuche vor allem eine hohe Ausnutzung des physiologischen Nutzwertes des Heues, wie bei niedriger, so auch bei hoher Temperatur. Der Produktionswert oder die nutzbare Energie des Heues betrug in dem Versuche bei 0° 72,8%, bei 30° C 67,8% der hinzugefügten umsetzbaren Energie. Und auch hier erwies sich der Nutzeffekt des Heues trotz der Bedingungen der gleichen Ernährung des Kaninchens bei niedriger Temperatur als höher, denn bei hoher. Der Unterschied in der Verwertung der Heuenergie war wohl hier ein geringer, und diese Tatsache einerseits, die beträchtliche Nutzbarkeit der Energie des Rauhfutters bei hoher Temperatur andrerseits rücken den Standpunkt hervor, daß in den Bedingungen der nützlichen Wirkung des physiologischen Nutzwertes des Rauhfutters die größte Rolle die Ernährung des Kaninchens spielt — d. h. das Verhältnis der im Futter aufgenommenen Energie zu dem Bedürfnisse des Tieres. Die Umgebungstemperatur übt aber einen verhältnismäßig geringen Einfluß aus, und ihre Rolle äußert sich nur insofern, als sie die oxydierende Tätigkeit des Tieres verstärkt und sein Bedürfnis im Nahrungsmaterial steigert. Wir haben schon in der ersten Versuchsserie konstatiert, daß bei Verabreichung einer gleichen Ration bei verschiedener Umgebungstemperatur die Verwertung der umsetzbaren Energie des Heues sich in strenger Abhängigkeit von dieser letzteren befindet. Jetzt ist es uns verständlich, daß diese Erscheinung hauptsächlich nur deshalb stattfand, weil die verschiedene Umgebungstemperatur einen beträchtlichen Unterschied in der Ernährung des Kaninchens hervorrief und dieser Faktor eine prävalierende Wirkung auf die Verwertung der umsetzbaren Energie des Heues ausübte. Jedenfalls weist der letzte Versuch mit dem Kaninchen D darauf hin, daß eine hohe Temperatur einer ansehnlichen Verwertung des Rauhfutters nicht hinderlich ist, wenn nur der Nahrungsbedarf des Kaninchens größer als der physiologische Nutzwert des Heues ist. Mit

anderen Worten, bei gleicher Ernährung des Kaninchens ist die Ausnutzbarkeit der Energie des Heues bei hoher Temperatur nur etwas geringer als bei niedriger.

Versuche mit einem hungernden Kaninchen.

Zuletzt wollen wir die Ergebnisse noch zweier Versuche bei 0° und bei 30° C anführen, die an einem hungernden Kaninchen B angestellt wurden. Jeder Versuch dauerte 6 Tage; die ersten 3 Tage hungerte das Kaninchen, die letzten drei bekam es täglich 50 g von demselben Heu, das in den früheren Versuchen verabreicht wurde. Das Heu wurde mit 150 ccm kochenden Wassers begossen und nach der Abkühlung dem Kaninchen vorgelegt. Während der mittleren 4 Tage des Versuchs, d. h. 2 Tage des Hungerns und 2 Tage der Fütterung mit Heu, wurde das Kaninchen in den Respirationsapparat zur Bestimmung der Menge der ausgeatmeten CO_2 gestellt. Die Resultate dieser Versuche sind in folgender Protokolltabelle angeführt.

		Kot		Harn					CO_2 in der Respiration	Lebendgewicht
		Frisch	Lufttrock.	Menge	mit Spülwasser	N	C	Cal.		
		g	g	ccm	ccm	g	g		g	g
				I. Versuch. 0° C.						
Okt. 28.	Hunger	5	4,5	58	200	0,937				1455
29.	,,	—	—	40	200	1,362	1,728	10 ccm: 0,540	39,0	1375
30.	,,	—	—	66	200	0,853	N:C 1:0,78	21,600	36,5	1330
								pr. g Kohlenstoff		
Pro Tag		—	—	54,7		1,050	0,864	12,5	37,7	
Okt. 31.	50 g Heu + 150 ccm Wasser	72	31	71	300	0,710	2,151 N:C	16,347	43,0	1253
Nov. 1.	,,	99	35	106	300	1,200	1:1,12		41,0	1257
2.	,,	84	32	95	300	1,120				1198
								pr. g Kohlenstoff		
Pro Tag		85	32,7	90,7		1,010	1,131	7,6	42,0	
				Versuch. 30° C.						
Nov. 10.	Hunger	—	—	43	150	0,790				1295
11.	,,	—	—	92	150	0,481	1,032 N:C	20 ccm: 0,509	23,0	1323
12.	,,	—	—	124	300	0,931	1:0,73	11,455	21,0	1205
								pr. g Kohlenstoff		
Pro Tag		—	—	86,3		0,734	0,536	11,1	22,0	
Nov. 13.	50 g Heu + 150 ccm Wasser	38	29,8	68	300	0,400			31,0	1188
14.	,,	45	33,0	153	300	0,585	1,094 N:C	7,658	33,0	1162
15.	,,	37	32,0	90	300	0,467	1:1,04			1146
								pr. g Kohlenstoff		
Pro Tag		40	31,6	103,7		0,484	0,503	7,0	32,0	

Der chemische Bestand des Heues ist schon früher angegeben; die Zusammensetzung der Trockensubstanz der Exkremente und der Wärmewert derselben waren folgende:

	Menge der Trockensubstanz		Organische Stoffe	Stickstoff	Kohlenstoff	Verbrennungswärme pro g
	%	g	%	%	%	cal.
I. Versuch	91,90	30,05	92,90	1,35	46,12	4490,9
II. „	91,98	29,07	92,95	1,22	46,11	4514,0
Durchschnitt		29,6	92,72	1,28	46,12	4502,4

Da die Schwankungen der Exkrementmenge in beiden Versuchen wie auch des Bestandes derselben unbedeutend waren und unzweifelhaft durch Mängel in der Technik der Versuche hervorgerufen wurden, so wollen wir zur Vermeidung überflüssiger Ungenauigkeiten in unseren weiteren Berechnungen für beide Versuche mittlere Größen wie für die Menge der Exkremente, so auch für ihre Zusammensetzung benutzen. Wenn wir die ermittelten Größen für die Exkremente aus den betreffenden Zahlen für das verabreichte Heu abziehen, so erhalten wir die Menge der verdauten organischen Stoffe, wie auch den Energiegehalt desselben.

	Organische Stoffe	Stickstoff	Kohlenstoff	Energie-Inhalt
50 g Heu = 44,94 g Trockensubstanz	41,91 g	0,566 g	20,334 g	198,78 Cal.
Exkremente = 29,6 g Trockensubstanz	27,44 g	0,379 g	13,651 g	133,27 Cal.
Verdaut	14,47 g	0,187 g	6,683 g	65,48 Cal.

Der physiologische Nutzwert des Heues.

Zur Bestimmung des physiologischen Nutzwertes des Heues muß man aus der Energie des verdauten Stoffes die Energie im Harn abziehen. Aus der oben angeführten Protokolltabelle geht hervor, daß der Energiegehalt des Harns in dem Versuche bei 0° 8,59 Cal., bei 30° 3,52 Cal. beträgt. Nach dem Beispiele der früheren Versuche korrigieren wir diese Energie, indem wir die aus dem Körpereiweiß entstandene Stickstoffmenge des Harns in Betracht ziehen und, wie früher, den Faktor 7,45 Cal. für 1 g des Stickstoffs annehmen. Die unten angeführte Tabelle des Stick- und Kohlenstoffumsatzes zeigt, daß in dem Versuche bei 0° bei Verabreichung des Heues das Kaninchen aus dem Körper 0,823 g Stickstoff, bei 30° 0,297 g verlor. Also kommen dem zerfallenen Eiweiß des Körpers im ersten Versuche 6,13 Cal., im zweiten 2,21 Cal. zu. Somit bleiben für das Heu im ersten Versuche bei 0° 2,46 Cal. Energie im Harn, im Versuche bei 30° 1,31 Cal., im Mittel 1,88 Cal. nach. Indem wir diese Größe aus der Energie des verdaulichen Teiles des Heues abziehen, finden wir den physiologischen Nutzeffekt des Heues, der 63,60 Cal. oder pro Gramm der verdauten organischen Substanz 4394 Cal. gleicht.

Wollen wir jetzt betrachten, wie diese Energie des Heues bei niedriger und bei hoher Umgebungstemperatur ausgenützt wird. Zu diesem Zwecke berechnen wir den Stick- und Kohlenstoffumsatz und die Menge

des zersetzten Eiweißes und Fettes beim Hungern und bei der Heufütterung.

Einnahme und Ausgabe von Stickstoff und Kohlenstoff pro Tag.

	Aufnahme g		Abgabe g						
			Stickstoff			Kohlenstoff			
	Stickstoff	Kohlenstoff	im Harn	im Kot	Summe beider	in der Respiration	im Harn	im Kot	Summe
I. Versuch.	Hunger		1,050	—	1,050	10,282	0,864	—	11,146
0° C.	0,566	20,334	1,010	0,379	1,389	11,454	1,131	13,651	26,236
II. Versuch.	Hunger		0,734	—	0,734	6,000	0,536	—	6,536
30° C.	0,566	20,334	0,484	0,379	0,863	8,727	0,503	13,651	22,881

Verlust an Protein und Fett pro Tag.

	Gewinn an Stickstoff g	Entsprechendes Eiweiß $N \times 6,0$ g	Gewinn an Kohlenstoff		Entsprechendes Fett $C \times 1,3$ g	Gewinn Eiweiß und Fett in Cal.
			Insgesamt g	Eiweiß-C abgezogen Als Fett g		
I. Versuch.	Hunger — 1,050	— 6,30	— 11,146	— 7,836	— 10,18	— 132,62
0° C.	Heu — 0,823	— 4,94	— 5,902	— 3,307	— 4,30	— 69,01
II. Versuch.	Hunger — 0,734	— 4,404	— 6,536	— 4,221	— 5,49	— 77,26
30° C.	Heu — 0,297	— 1,782	— 2,547	— 1,612	— 2,10	— 30,11

Aus den angeführten Zahlen ersehen wir, daß beim Hungern die Energie des Zerfalles des Körpereiweißes und Körperfettes bei 0° 132,62 Cal., bei 30° 77,26 Cal. beträgt. In beiden Fällen überwog das Bedürfnis des Tieres im Nahrungsmaterial die Menge des physiologischen Nutzwerts im Heu bedeutend, nämlich bei 0° betrug die aufgenommene Energie im ganzen gegen 48%, bei 30° 82% des gesamten Bedarfs des Tieres, Und dennoch bestand ein wesentlicher Unterschied zwischen der Verwertung der umsetzbaren Energie des Heues bei 0° und bei 30°. Während die Gabe von 50 g Heu die Zersetzung des Eiweißes und des Fettes bei 0° C bis auf 69,01 Cal. herabsetzte, bewirkte sie bei 30° eine Abnahme bis auf 30,11 Cal., d. h. die nützliche Wirkung des Heues betrug im ersten Falle 63,61 Cal., oder 100%, im zweiten 47,15 Cal. oder 74,1% des gesamten physiologischen Nutzwertes. Hier konstatieren wir vor allem die Tatsache einer vollen Verwertung der umsetzbaren Energie des Rauhfutters, die das Rubnersche Gesetz der isodynamen Vertretung der Nährstoffe im vollen Umfange bestätigt. Wir beobachten hier ferner denselben Unterschied in der Ausnutzung der Energie des Heues im Zusammenhang mit der Umgebungstemperatur, der sich in den vorigen Versuchen mit dem Kaninchen D äußerte. Es tritt hier wohl in den Ernährungsbedingungen des Kaninchens B bei 0° und bei 30° wieder ein recht wesentlicher Unter-

schied ein, gleich wie dies in den Versuchen mit dem Kaninchen C der Fall war, aber hier konnte dieser Unterschied keinen genügend merklichen Einfluß ausüben, da die Größe des Eiweiß- und Fettzerfalles der Gewebe, wie bei 0°, so auch bei 30° die Menge der umsetzbaren Energie des Heues bedeutend überwog. Dennoch war es von Interesse, einen Versuch mit einem hungernden Kaninchen bei hoher Temperatur anzustellen, indem man ihm so viel Heu verabreicht, daß der physiologische Nutzwert nicht mehr als 50% des Bedürfnisses des Tieres beim Hungern beträgt, wie dies in unserem Versuche bei 0° C der Fall war.

Indem wir ferner den Verwertungskoeffizienten des Heues bei 30° vergleichen, die wir in dem Versuche mit dem Kaninchen D und dem hungernden Kaninchen B erhalten, müssen wir auf folgende Erscheinung unsere Aufmerksamkeit lenken. Trotzdem das Nahrungsbedürfnis bei dem hungernden Kaninchen B bedeutend größer als bei dem Kaninchen D war, steigerte sich der Verwertungskoeffizient des Rauhfutters nur sehr unbedeutend. Dieser Umstand gibt einigen Anlaß zu der Vermutung, daß bei hoher Umgebungstemperatur eine Grenze in der Verwertung der umsetzbaren Energie des Rauhfutters existieren muß, daß die letztere sogar dann nicht vollständig verwertet wird und ein Teil derselben für das Tier verloren geht und nur die Wärmeproduktion steigert, wenn die Zufuhr dieser Energie viel geringer als das Bedürfnis des Organismus ist.

Zum Schlusse gruppieren wir die von uns erhaltenen Resultate der Verwertung des physiologischen Nutzwertes des Heues durch die Kaninchen in eine Tabelle. In den ersten drei vertikalen Reihen sind die Mengen der von den Tieren aufgenommenen umsetzbaren Energie des Futters, das Nahrungsbedürfnis der Tiere und das Verhältnis dieser beiden Größen angeführt. In den zwei letzten Reihen ist die Nutzwirkung oder der Produktionswert des Heues in Cal. und in % des gesamten physiologischen Nutzwertes desselben angegeben.

	Zufuhr Cal.	Bedarf Cal.	Verhältnis d. Zufuhr zum Bedarf 1:100 %	Nutzbarkeit	
				reine umsetzbare Energie vom Heu Cal.	%
		Versuche bei 0° C.			
Kaninchen A	116,30	138,47	84	34,22	88,7
„ C	161,43	180,12	90	31,16	71,0
„ D	119,45	148,80	80	28,82	72,8
„ B	63,60	132,62	48	63,61	100
		Versuche bei 30° C.			
„ A	116,30	105,80	110	16,69	43,3
„ C	121,62	104,11	117	14,07	33,6
„ D	64,25	71,66	89	31,96	67,8
„ B	63,60	77,26	82	47,15	74,1

Aus dieser Tabelle ergibt sich vor allem die recht wichtige Folgerung, nämlich, daß das Rubnersche Gesetz der isodynamen Vertretung seine Gültigkeit auch bei der Fütterung mit Rauhfutter behält, aber unter der Bedingung, wenn die Menge der physiologischen nutzbaren Energie des Rauhfutters im ganzen nur ungefähr die Hälfte des gesamten Nahrungsbedarfs des Tieres ausmacht, und wenn das Tier sich bei niedriger Umgebungstemperatur befindet.

Es läßt sich noch nicht mit Bestimmtheit sagen, ob das Gesetz der Isodynamie sich auch bei hoher Temperatur beobachten läßt. Die Versuche zeigen nur, daß bei hoher Umgebungstemperatur, wenn auch der physiologische Nutzwert des Rauhfutters im ganzen ungefähr 80% des Bedarfs des Tieres beträgt, die Nutzbarkeit dieser Energie nicht 70% überragt.

Unsere Versuche zeigen auch, daß man in der Verwertung der umsetzbaren Energie des Rauhfutters die erste Rolle dem Verhältnis der Menge dieser Energie im Futter zum Bedürfnisse des Tieres anweisen muß, und daß die Umgebungstemperatur eine untergeordnete Bedeutung hat. Wenn nur der physiologische Nutzwert vom Futter geringer ist als der Bedarf des Tieres, so kann die Verwertung beträchtliche Dimensionen auch bei hoher Temperatur erreichen. Aber doch war in allen Versuchen bei gleicher Ernährung des Kaninchens der Produktionswert des Rauhfutters bei niedriger Temperatur etwas größer als bei hoher.

Anhang.

I. Tabelle.

I. Serie. Kaninchen A.

I. Versuch. 20° C.

	Kot g		Harn					Respiration CO_2	Lebendgewicht
	Frisch	Lufttrocken	Menge ccm	mit Spülwasser ccm	N g	C g	Cal.	g	g
I. Periode									
Sept. 21.	23	12	85	—	—	—			1320
22.	9	7,0	76	—	—	—			1297
23.	12	9,0	118	400	0,980	0,728			1310
24.	12	8,5	88	300	0,612	1,006			1257
25.	13	11,0	85	300	0,708			30,5	1257
26.	14	12,0	100	400	1,092	1,291	20 ccm: 0,372 13,039		1246
27.	8	8,0	88	300	0,645			31,0	1202
28.	16	12,7	102	400	0,928	1,221			1220
29.	11	9,5	103	300	1,032				1190

	Kot g		Harn					Respiration CO_2	Lebendgewicht
	Frisch	Lufttrocken	Menge ccm	mit Spülwasser ccm	N g	C g	Cal.	g	g
Pro Tag	12,3	10,1	98,0		0,857	0,606	Pro g Kohlenstoff 10,1	30,8	
II. Periode									
Sept. 30.	42	33,0	67	300	0,774	—			1167
Okt. 1.	57	39,5	81	300	0,723	—			1210
2.	79	44,0	142	300	0,778	1,476 (2.–3.)		38,0	1210
3.	41	30,5	88	300	0,708				1192
4.	67	40,0	85	300	0,708		20 ccm: 0,315 13,387	38,0	1205
5.	57	38,0	90	500	0,774	1,911 (5.–6.)			1224
6.	62	40,6	96	350	0,587				1201
7.	62	42,4	76	300	0,579	1,458 (7.–8.)			1180
8.	61	41,2	90	350	0,570				1195
Pro Tag	58,7	38,8	95,3		0,672	0,808	Pro g Kohlenstoff 7,0	38,0	
II. Versuch. 0° C.									
I. Periode									
Okt. 11.	34	17	—	—	—				1340
12.	7	6	—	—	—				1225
13.	23	15	100	300	0,903				1195
14.	14	9,0	123	300	1,115	1,877 (14.–15.)			1170
15.	11	7,5	98	300	0,900			37,8	1154
16.	18	10,2	110	300	1,683	2,302 (16.–17.)	20 ccm: 0,8287 24,861		1147
17.	14	7,0	109	300	1,490			40,2	1005
18.	24	12,8	100	300	1,290	2,311 (18.–19.)			1087
19.	19	10,5	100	400	1,711				1062
20.			140	500	1,870	1,390			
Pro Tag	16,7	9,5	111,4		1,437	1,125	Pro g Kohlenstoff 10,8	39,0	
II. Periode									
Okt. 20.	85	40,5	—	—	—				1012
21.	79	37,0	90	350	1,218				975
22.	76	29,0	100	300	1,347			42,8	955
23.	95	42,0	86	350	1,662	2,640 (23.–24.)		41,6	939
24.	90	40,0	74	350	1,307				910
25.	91	37,4	115	300	1,089	2,570 (25.–26.)	20 ccm 0,7024 21,072	41,0	925
26.	102	44,5	72	300	1,134				887
27.	94	39,6	75	400	0,928	2,528 (27.–28.)			865
28.	92	41,0	80	300	1,148				855
Pro Tag	78,2	39,0	83,7		1,211	1,289	Pro g Kohlenstoff 8,2	41,8	

III. Versuch. 30° C.

	Kot g		Harn					Respiration CO_2 g	Lebendgewicht g
	Frisch	Lufttrocken	Menge ccm	mit Spülwasser ccm	N g	C g	Cal.		
I. Periode									
Nov. 16.	25	24	—	—	—				
17.	9	8,5	57	200	0,720				1285
18.	18	17,0	27	200	0,520				1262
19.	15	13,0	30	150	0,686				1240
20.	5	4,5	65	100	0,665	1,071		31,5	1223
21.	10	9,5	35	150	0,470				1233
22.	6	5,4	—	—	—		20 ccm: 0,6378 12,759		1233
23.	17	14,6	85	200	1,260	1,373			
24.	9	8,2	25	200	0,375				1210
25.	5	4,5		—	—	0,945		29,5	1236
26.	16,5	14,5	120	300	1,320				1300
Pro Tag	10,4	9,3	45,0		0,597	0,484	Pro g Kohlenstoff 9,3	30,5	
II. Periode									
Nov. 27.	46	30,0	22	200	0,490				1215
28.	62	42,0	36	250	0,675				1245
29.	62	41,6	88	300	0,735				1270
30.	57	39,5	110	200	0,550	1,632			1256
Dez. 1.	50	37,4	75	300	0,666				1260
2.	73	38,0	65	300	0,405	1,357	20 ccm: 0,3302 9,906	42,0	1265
3.	49	38,5	57	300	0,690				1255
4.	50	36,5	135			1,287		38,0	1254
5.	56	42,0		300	1,040				1315
6.	59	41,4	145			1,693		39,0	1290
7.	45	38,6		400	1,340				1280 8. Dez.
Pro Tag	55,4	38,7	73,4		0,586	0,746	Pro g Kohlenstoff 7,3	39,2	

II. Tabelle.

2. Serie. Kaninchen C.

I. Versuch. 0° C.

	Kot g		Harn					Respiration CO_2	Lebendgewicht
	Frisch	Lufttrocken	Menge ccm	mit Spülwasser ccm	N g	C g	Cal.	g	g
I. Periode									
Jan. 10.	36	24	145						
11.	5	3,5	160						1733
12.	10,0		137	350	1,505				1690
13.	11,5		108	300	1,170				1674
14.	15,5		150	300	1,665	2,815		53,5	1680
15.	20,0		100	300	1,305				1627
16.	8,0	81,0	128	300	1,425		20 ccm:		1622
17.	10,0		105	300	1,507	2,875	0,6900	50,5	1610
18.	16,0		110	300	1,425		31,05		1607
19.	10,5		115	300	1,455				1598
20.	12,5		105	300	1,200	3,049		51,5	1595
21.			130	300	1,896				
Pro Tag	12,7	9,0	116,8		1,450	0,971	pr. g Kohlenstoff 10,8	51,8	
II. Periode									
Jan. 21.	83								1575
22.	86		130	300	1,215				1566
23.	67		160	300	1,380				—
24.	60		116	300	1,020		10 ccm:		1560
25.	80	403,7	190	350	1,780	4,309	0,4127	58,0	1534
26.	65		150	300	1,236		39,212		1540
27.	60		145	300	1,203		10 ccm:		1540
28.	76		150	300	1,433	4,007	0,3695	58,8	1535
29.	67		150	300	1,239		33,258		1537
30.	80		145	300	1,512	2,892		56,0	1525
31.	52		145	300	1,185				1525
Pro Tag	70,6	36,7	148,9		1,326	1,401	pr. g Kohlenstoff 8,7	57,6	

II. Versuch. 30° C.

	Kot g		Harn					Respiration CO_2	Lebendgewicht
	Frisch	Lufttrocken	Menge ccm	mit Spülwasser ccm	N g	C g	Cal.	g	g
I. Periode									
Febr. 27.	5		85	300	1,233				1664
28.	10								1598
29.	8,5		70	200	1,345				1555
März 1.	10,0								1630
2.	9,5		125	300	1,508			33,2	1565
3.	7,5								—
4.	9,0	71,8	90	200	0,720			33,5	1585
5.	12		50				20 ccm:		1558
6.	9		—	500	2,240	2,062	0,7669	30,5	1538
7.	11		120				19,172		—
Pro Tag	9,5	9,0	64,5		0,744	0,687	pr. g Kohlenstoff 9,3	32,4	
II. Periode									
März 8.	42		130	250	1,280				1535
9.	50		60	200	0,481				1520
10.	52		120	300	0,681				1570
11.	48		120	300	0,699			40,5	1570
12.	45	334,8	80	300	1,116	3,964	20 ccm:		1585
13.	52		75				0,743	40,5	—
14.	48		165	350	1,260		48,295		—
15.	50		80	350		1,850			1538
16.	48		60		1,423				1545
Pro Tag	48,3	37,2	96,7		0,749	0,969	pr. g Kohlenstoff 8,3	40,5	

Note: values printed with braces in the original apply to several days together. In I. Periode: 85 covers Febr. 27–28; 70 covers 29–März 1; 125 covers 2–3; 71,8 covers 29–7; 500, 2,240, 2,062 and the Cal. entry cover 5–7. In II. Periode: 334,8 covers 8–16; the 300 printed at 12 covers 12–13; 3,964 covers 11–14; the Cal. entry covers 11–16; the 350 printed at 15 and 1,850 cover 15–16.

Versuche mit Kaninchen D.

I. Versuch. T. 0° C.

	Kot g		Harn					Respiration CO_2 g	Lebendgewicht g
	Frisch	Lufttrocken	Menge ccm	mit Spülwasser ccm	N g	C g	Cal.		
I. Periode									
Jan. 31.	14,0	11,0	130	300	0,980				1690
Febr. 1.	6,5	6,0	160	300	0,911				1617
2.	20,5		125	300	0,885				1564
3.	12,5		120	300	1,026				1532
4.	16,0		98	300	0,750			42,8	1520
5.	9,0		140	300	1,352				1530
6.	16,0	82,0	110	300	1,203				1485
7.	12,5		118	300	1,318	2,650	30,951	43,5	1465
8.	13,0		135	300	1,964				1460
9.	12,0		120	300	1,628	2,515	30,102		1415
10.	19,0		145	300	2,028			41,8	1390
Pro Tag	14,5	9,1	125,6		1,628	1,083	Pro g Kohlenstoff 11,8	42,5	
II. Periode									
Feb. 11.	92		120	300	1,752				1340
12.	90		130	300	1,239				1330
13.	72		125	350	0,951				1315
14.	82		150	350	0,951			48,0	1350
15.	86		155	350	1,414	3,837	34,492		1335
16.	85	399,3	135	350	1,153				1290
17.	84		115	300	0,840			47,5	1290
18.	90		150	300	1,371	3,582	30,465		1290
19.	74		130	300	1,167				1208
20.	80		110	300	0,911			48,6	1272
21.	80		155	350	1,340				—
Pro Tag	83,2	86,3	137,5		1,143	1,236	Pro g Kohlenstoff 8,7	48,0	

II. Versuch T. 30° C.

	Kot g		Harn					Respiration CO_2	Lebendgewicht
	Frisch	lufttrocken	Menge ccm	Mit Spülwasser ccm	N g	C g	Cal.	g	g
I. Periode									
März 25.	8		65						
26.	3		—						1500
27.	7,0		55	300	0,850				—
28.	0,8		90						1490
29.	9,0		30			1,490			
30.	11,0		70	350	1,486				1460
31.	2,0	38,0	80						
April 1.	7,0		105	350	1,344	2,468	19,990	21,0	—
2.	3,0		80	200	0,515				
3.	6,0		105	200	0,600			19,0	1380
Pro Tag	5,5	5,4	80,0		0,563	0,565	Pro g Kohlenstoff 8,1	20,0	
II. Periode									
April 4.	36		55						1335
5.	35		75	300	0,720				1410
6.	33		130	300	0,737				
7.	34		105	200	0,366				
8.	32		75			3,172	22,848		
9.	31	381,6	100	300	0,835			27,5	1400
10.	34		105	200	0,496				
11.	35		95	200	0,514			25,0	
12.	31		65						1365
13.	30		80	300	0,920	5,018	35,052		—
14.	38		120					27,5	1390
15.	35		105	400	1,090				—
Pro Tag	33,7	31,8	94,4		0,469	0,910	Pro g Kohlenstoff 7,1	2,66	

Über die Regulierung der physikochemischen Eigenschaften des Blutes nach Injektionen von verschiedenen Lösungen.

Von

G. Buglia.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Neapel.)

(Eingegangen am 12. August 1908.)

Mit 14 Figuren im Text.

I. Ziel der Untersuchungen.

Von den wichtigsten Untersuchungen aus jüngster Zeit über die Zusammensetzung des Blutes nach intravenösen Injektionen salzhaltiger Lösungen sind die Arbeiten von Dastre und Loye[1]), von Grosglik[2]) und von Loeper[3]) zu erwähnen, die mit den Flüssigkeiten des Organismus isotonischen Lösungen experimentierten; ferner die Untersuchungen von Hamburger[4]), von Achard und Loeper[5]) und von Ouschinsky[6]) mit hyper- oder hypotonischen Lösungen.

Durch Injektionen von isotonischen Lösungen wollte man

---

[1]) A. Dastre und P. Loye, Nouvelles recherches sur l'injection de l'eau salée dans les vaisseaux. Arch. de Physiol. norm. et pathol. 1889, 253, 285. — Le lavage du sang. Ibid, 1888, 93.

[2]) A. Grosglik, Contribution à l'étude de la pléthore hydrémique. Arch. de Physiol. norm. et pathol. 1890, 704, 713.

[3]) M. Loeper, Les diluitions du sang. Journ. de Physiol. et de Pathol. génér. 5, 79, 94, 1903.

[4]) H. J. Hamburger, Osmotische Verhältnisse des zirkulierenden Blutes unter verschiedenen experimentellen Eingriffen. Zeitschr. f. Biol. **27**, 259, 1890.

[5]) M. Loeper, Mécanisme régulateur de la composition du sang. Paris 1903.

[6]) Ouschinsky, De l'injection dans le sang de solutions hypertoniques. Soc. des médecins de Varsovie **1903**, Soc. 13 Déc.

erkennen, welche Mechanismen der Wasserregulierung des Organismus in Tätigkeit treten, wenn letzterer sich in einem Zustand von hydrämischer Plethora befindet. Durch hyper- und hypotonische Injektionen suchte man vor allem festzustellen, welche Zeit dazu erforderlich ist, daß die nach der Injektion rasch veränderte Konzentration der Salze, mithin der gesamte osmotische Druck des Blutes zu normalen Bedingungen zurückkehrt. Man studierte die Schwankungen der Verdünnung des Blutes, indem man sowohl direkte Bestimmungen des Wassergehaltes ausführte als auch das Albumin im Serum quantitativ bestimmte oder sie aus der Zahl der roten Blutkörperchen oder aus dem Verhältnis zwischen dem Volum der letzteren und der flüssigen Masse einer gegebenen Menge Blut folgerte. Die Schwankungen der Konzentration der Salze wurden festgestellt sowohl vermittels der chemischen Analyse als auch indirekt durch Bestimmung des Gefrierpunktes.

Obgleich die Schlußfolgerungen, zu welchen die verschiedenen zitierten Autoren gelangten, miteinander übereinstimmen, habe ich es doch nicht für überflüssig gehalten, diese Untersuchungen wieder aufzunehmen. Dabei wollte ich einerseits ausführlicher, als es bis jetzt geschehen ist, die Veränderungen des Blutes bis zur Rückkehr der normalen Bedingungen verfolgen; andrerseits schienen Experimente, die ich zu verschiedenen Zwecken in unserem Laboratorium zu machen Gelegenheit hatte, einige von den Resultaten dieser Autoren nicht immer vollständig zu bestätigen. Dazu kam der Wunsch, einige von den physikochemischen Methoden zu verwenden, die bei diesen Untersuchungen noch nicht zur Anwendung gekommen waren. Während ich so in verschiedenen Zeitintervallen nach Injektion einer hyper- oder hypo- oder isotonischen Lösung die Schwankungen der molekularen Konzentration des defibrinierten Blutes vermittels der kryoskopischen, die Schwankungen des unter normalen Verhältnissen zwischen den Blutkügelchen und dem Plasma bestehenden Verhältnisses vermittels der hämatokritischen Methode zu bestimmen suchte, führte ich gleichzeitig am Blutserum Bestimmungen der elektrischen Leitfähigkeit und der Viscosität aus.

II. Experimentelle Technik.

Nach Entnahme einer ersten Probe normalen Blutes aus einer Arterie des Tieres injizierte ich direkt in die dieser Arterie entsprechende Vene eine hyper-, iso- oder hypotonische Flüssigkeit; in verschiedenen Zeitintervallen wurden dann neue Blutproben derselben Arterie entnommen. Einen Teil dieses Blutes ließ ich im geschlossenen Gefäß gerinnen, während ich einen anderen Teil defibrinierte. Das aus den Proben von geronnenem Blut gebildete Serum diente mir zu den Bestimmungen der elektrischen Leitfähigkeit und der Ausflußzeit, das defibrinierte Blut zur Bestimmung der molekularen Konzentration und zur hämatokritischen Untersuchung. Bei einigen Experimenten wurde auch der von dem Tier vorher, während des Experimentes und nach demselben entleerte Harn aufgefangen und davon der Gefrierpunkt, die elektrische Leitfähigkeit und die Ausflußzeit bestimmt. Als Versuchstiere wählte ich erwachsene Hunde von großem Körpergewicht (15 bis 20 kg), die einige Tage im Laboratorium blieben und seit vielen Stunden hungerten. Die ihnen bei jedem Aderlaß entzogene Menge Blut betrug ca. 50 ccm. Das Zeitintervall zwischen einer Blutentziehung und der folgenden variierte nicht sehr bei den verschiedenen Experimenten: eine Blutprobe wurde kurze Zeit nach der Injektion entnommen, eine zweite ungefähr eine Stunde nachher, die anderen im Abstand von 2, 4, 6, 8 und auch 24 Stunden nach der ersten Blutentziehung. Die Kanülen und Schläuche, vermittels deren das Blut der Arterie entnommen worden war, wurden jedesmal sorgfältig gereinigt und abgetrocknet. Ehe das für die Analysen bestimmte Blut aufgefangen wurde, ließ ich zuvor eine kleine Menge Blut abfließen.

Während des Experimentes war das Tier auf dem Fixationsapparat unbeweglich gehalten, und ich trug Sorge dafür, es in wollene Tücher einzuhüllen, damit es sich nicht erkältete; wenn ich jedoch eine Blutprobe lange Zeit nach Beginn des Experimentes (24 Stunden) entnahm, ließ ich das Tier in den letzten Stunden frei.

Die von mir injizierten, bis auf eine Temperatur von 37° C erwärmten Flüssigkeiten waren Lösungen von Chlornatrium und Trinkwasser; bei einigen Versuchen verwendete ich auch

Lösungen von Rohrzucker, um den Einfluß der Anelektrolyten zu erkennen. Von diesen Flüssigkeiten waren der Gefrierpunkt und die elektrische Leitfähigkeit bekannt. Das Volum der injizierten Lösung war im Verhältnis zum Gewicht des Tieres verschieden, und zwar wurde bei jedem Experiment das Verhältnis von 10 ccm pro Kilogramm Körpergewicht des Tieres beibehalten. Nur in besonderen Fällen wurde dieses Verhältnis geändert, um die allzu intensive direkte Einwirkung stark konzentrierter Lösungen auf die Elemente des Blutes zu verhindern oder den Einfluß der hydrämischen Plethora zu studieren. Da ferner aus den Untersuchungen von Dastre und Loye[1]) bekannt ist, welchen Einfluß die Geschwindigkeit der Injektion auf die Schnelligkeit ausübt, mit welcher die Wasserregulierung des Organismus nach Injektionen von physiologischer Lösung zustande kommt, sorgte ich dafür, daß ich bei meinen Experimenten weder eine allzu große noch eine zu geringe Geschwindigkeit der Injektion beibehielt. Im Gegensatz dazu wurden einige Experimente wiederholt, bei denen die Geschwindigkeit der Injektion verschieden war.

Was die Bestimmungen der elektrischen Leitfähigkeit betrifft, die bei einer Temperatur von 37° C an dem Blutserum vorgenommen wurden, das ich zentrifugiert hatte, bis es hell war, so verwendete ich die Methode von Kohlrausch; zur Festsetzung der Schwankungen der Ausflußzeit (ebenfalls bei 37° C) verwendete ich das Ostwaldsche Viscosimeter.

Die molekulare Konzentration des defibrinierten Blutes wurde vermittels des Beckmannschen Apparates bestimmt, das relative Volumen der roten Blutkörperchen durch den Hedinschen Hämatokrit.

III. Experimente.

Die Resultate eines jeden Experimentes sind in besonderen Tabellen zusammengestellt. Einer jeden Tabelle ist eine graphische Darstellung beigefügt, welche die sich aus den Werten ergebenden Kurven wiedergibt, die ich bei den verschiedenen physiko-chemischen Untersuchungen des in den verschiedenen Zeitintervallen aufgefangenen Blutes erhalten hatte.

---

[1]) vide loc. cit.

Die in einer fortlaufenden Linie gezeichnete Kurve bezieht sich auf die molekulare Konzentration, die mit langen Strichen auf die Schwankungen der elektrischen Leitfähigkeit, die mit kurzen Strichen auf die mit dem Hämatokriten erhaltenen Werte, die punktierte endlich auf die Bestimmungen der Ausflußzeit.

Einfluß der Blutentziehungen.

1. Experiment. — 21. Januar 1908. — (Temperatur der Umgebung 10° C.)

♂ Hund von 19,300 kg Gewicht, der seit 24 Stunden hungert.

9h 0' vormittags:	Der linken A. femoralis werden 50 ccm Blut entnommen; 40 ccm lasse ich spontan in geschlossenem Gefäß bei der Temperatur der Umgebung gerinnen; die anderen 10 ccm werden defibriniert und ebenfalls in geschlossenem Gefäß bei der Temperatur der Umgebung aufbewahrt.
9h 30' „	Idem.
10h 30' „	„
11h 30' „	„
1h 0' nachmittags:	„
3h 0' „	„
5h 0' „	„
5h 5' „	Dem Tiere werden 200 ccm Blut entzogen.
5h 10' „	Auf die schon erwähnte Weise werden 50 ccm Blut aufgefangen.

Während des Experimentes hat das auf dem Fixierungsapparat unbeweglich liegende Tier weder Harn noch Fäces entleert.

Am Morgen des 22. Januar erfolgt die Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit und der Ausflußzeit des von den verschiedenen Blutproben gebildeten Serums; ferner wird der Gefrierpunkt und das Blutkörperchenvolum des defibrinierten Blutes bestimmt.

Die erhaltenen Werte sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Tabelle I. (1. Experiment.)

Aderlaß.

Aderlaß	Blut ccm	Zeit nach dem ersten Aderlaß in Stund.	Blutserum ccm Serum °/₀ Blut	Bemerkungen	Elektrische Leitfähigkeit (K × 10⁻⁴ 37° C)	Ausflußzeit bei 37° C (t)	Defibriniert. Blut Erniedrigung des Gefrierpunktes (Δ)	Hämatokrit (e)
1	50	—	45	klar	152,8	1′ 34″	0°,599	42
2	50	0,30′	37	„	152,1	1′ 34″	0°,602	42
3	50	1,30′	42	„	150,9	1′ 34″ 4/5	0°,608	41,5
4	50	2,30′	42	„	151,4	1′ 34″ 1/5	0°,598	40
5	50	4,0′	45	leicht rosenrot	152,0	1′ 34″	0°,597	40
6	50	6,0′	45	„	152,0	1′ 33″ 3/5	0°,593	39
7	50	8,0′	51	„	152,0	1′ 33″ 1/5	0°,593	40
8	50	8,10′	40	„	152,0	1′ 31″	0°,598	41
	400					(Ausflußzeit des H_2O bei 37° = 0′ 57″ 4/5)		

Aus den Zahlen der Tabelle und noch besser aus den durch sie erhaltenen Kurven ergibt sich klar, daß die infolge der wiederholten beim Tiere gemachten Aderlässe aufgetretenen physiko-chemischen Schwankungen des Blutes unbedeutend sind und fast unbeachtet bleiben können. Nach dem vierten Aderlaß erreichen die physiko-chemischen Konstanten des Blutes und des Serums von neuem den normalen Wert, und alle Kurven zeigen fortwährend bis zum Ende des Experimentes einen regelmäßigen Verlauf.

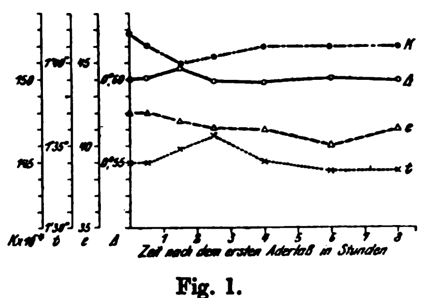


Fig. 1.

Injektion von hypertonischen Lösungen.
Chlornatrium.

2. Experiment. — 12. Februar 1908. — (Temperatur der Umgebung 11° C.)

♂ Hund von 18,05 kg Gewicht, der seit 24 Stunden hungert.

9^h 45′ vormittags:	Der linken A. femoralis werden 50 ccm Blut entnommen: 40 ccm lasse ich im geschlossenen Gefäß bei der Temperatur der Umgebung spontan gerinnen, die anderen 10 ccm werden defibriniert und ebenfalls im geschlossenen Gefäß bei der Temperatur der Umgebung aufbewahrt.
10^h 0′ „	Injektion von 410 ccm einer 10 %igen NaCl-Lösung in die rechte V. femoralis.
10^h 20′ „	Dem Tiere wird der Bauch zusammengepreßt, und auf diese Weise werden ca. 200 ccm Harn entleert.
10^h 30′ „	Idem.
10^h 40′ „	Beendigung der Injektion. Das Tier ist sehr aufgeregt und hat heftige Zuckungen; 180 Pulsschläge in der Minute.
10^h 45′ „	Entnahme von weiteren 50 ccm Blut, die auf die schon erwähnte Weise aufbewahrt werden.
11^h 15′ „	Entnahme einer dritten Harnprobe.
12^h 0′ „	Entnahme von 50 ccm Blut.
2^h nachmittags:	Das Tier stirbt.

Dauer der Injektion: 0^h 40′. Pro Kilogramm des Tieres injizierte Flüssigkeit: 22,7 ccm. — Pro Kilogramm und Minute: 0,56 ccm. — Gramme NaCl pro Kilogramm des Tieres 2,27.

Während des Experimentes lag das Tier unbeweglich auf dem Fixierungsapparat. Nach dem Tode wurde die Blase mit Harn gefüllt angetroffen. Am Morgen des 13. Februar wurden bestimmt: die elektrische Leitfähigkeit, die Ausflußzeit des durch die verschiedenen Blutproben gebildeten Serums, der Gefrierpunkt und das Blutkörperchenvolum des fibrinierten Blutes am Hämatokrit. Gleichzeitig ermittelte ich die elektrische Leitfähigkeit, die Ausflußzeit und die molekulare Konzentration der verschiedenen Harnproben. Die erhaltenen Werte sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Tabelle II. (2. Experiment.)

Injektion: 10%ige NaCl-Lösung.

ccm der injizierten Lösung pro Kilogramm Körpergewicht = 22,70.

g NaCl „ „ „ = 2,27.

	Blut									Harn				
				Blutserum				Defibriniertes Blut						
Aderlaß	Blut ccm	Zeit nach dem ersten Aderlaß in Stunden	Zeit nach dem Ende der Injektion in Stunden	ccm Serum %Blut	Bemerkungen	Elektrische Leitfähigkeit bei 37° C ($K \times 10^{-4}$)	Ausflußzeit bei 37° C (t)	Erniedrigung des Gefrierpunktes (△)	Hämatokrit (e)	Harnprobe	Zeit nach dem Anfang der Injektion in Stund.	Elektrische Leitfähigkeit bei 37° C ($K \times 10^{-4}$)	Ausflußzeit bei 37° C (t)	Erniedrigung des Gefrierpunktes (△)
1	50	—	—	37	klar, leicht rosenrot	144,2	1′ 33″	0°,588	49,5	1	0,20′	283,8	1′ 1″	2°,498
2	50	1,0′	0,5′	32	„	221,2	1′ 26″	0°,798	44	2	0,30′	275,2	0′ 59″1/5	2°,157
3	50	2,15′	1,20′	30	„	209,2	1′ 29″	0°,798	46	3	1,15′	177,6	0′ 59″	1°,098
	150						(Ausflußzeit des H_2O bei 37° C = 0′ 57″4/5)						(Ausflußzeit d. H_2O bei 37° C = 0′ 57⁴/5″)	

$K_{37°}$ der injizierten Lösung $1477,3 \times 10^{-4}$

△ „ „ „ 5°,63.

Während dieses Experimentes wurden, weil das Tier starb, nur drei Aderlässe vorgenommen. 1 Stunde 20 Minuten nach Beendigung der Injektion erhielten sich die molekulare Konzentration des Blutes und die elektrische Leitfähigkeit sehr hoch; auch die Werte der molekularen Konzentration sowie der elektrischen Leitfähigkeit der ersten während der Injektion aufgefangenen Harnprobe waren viel höher als unter normalen Verhältnissen. Die Viscosität des Blutserums und der hämatokritische Wert des defibrinierten Blutes, die infolge der Injektion abgenommen hatten, hatten dagegen die Tendenz, entsprechend dem dritten Aderlaß, wieder bis zum normalen Wert zu steigen. Gleichzeitig sanken molekulare Konzentration und elektrische Leitfähigkeit des Harns.

3. Experiment. — 23. Januar 1908. — (Temperatur der Umgebung 10° C.)

♂ Hund von 18,450 kg Körpergewicht, der seit 24 Stunden hungert.

$9^h 40'$ vormittags:	Aus der linken A. femoralis werden 40 ccm Blut aufgefangen: davon ließ ich 40 ccm im geschlossenen Gefäß bei der Temperatur der Umgebung spontan gerinnen; die anderen 10 ccm wurden defibriniert und ebenfalls im geschlossenen Gefäß und bei der Temperatur der Umgebung aufbewahrt.
$9^h 45'$,,	Das Tier entleert spontan 200 ccm Harn.
$9^h 47'$,,	In die rechte A. femoralis werden 184 ccm einer 10%igen NaCl-Lösung injiziert.
$9^h 52'$,,	Beendigung der Injektion.
$10^h 10'$,,	Entnahme von weiteren 50 ccm Blut aus der linken A. femoralis; sie werden auf die angegebene Weise aufbewahrt.
$11^h 10'$,,	Idem.
$12^h 10'$,,	,,
$1^h 40'$ nachmittags:	,,
$3^h 40'$,,	,,
$5^h 40'$,,	Das Tier wird aus dem Fixierungsapparat genommen.
24. Januar	
$9^h 50'$ vormittags:	Idem.

Dauer der Injektion: $0^h\ 5'$. **Pro Kilogramm des Tieres injizierte Flüssigkeit:** 10,0 ccm. **Pro Kilogramm und pro Minute:** 2,0 ccm. **Gramme NaCl pro Kilogramm des Tieres** 1,0.

Am Morgen des 24. Januar erfolgte die Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit und der Ausflußzeit des von den verschiedenen Blutproben gebildeten Serums, des Gefrierpunktes und des Blutkörperchenvolums des defibrinierten Blutes. Die erhaltenen Werte sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Tabelle III. (3. Experiment.)

Injektion: 10%ige NaCl-Lösung.

ccm der injizierten Lösung pro Kilogramm Körpergewicht = 10,0.
g NaCl „ „ „ = 1,0.

Aderlaß	Blut ccm	Zeit nach dem ersten Aderlaß in Stunden	Zeit nach dem Ende der Injektion in Stunden	Blutserum: ccm Serum %Blut	Blutserum: Bemerkungen	Blutserum: Elektrische Leitfähigkeit ($K \times 10^{-4}$ 37° C)	Blutserum: Ausflußzeit bei 37° C (t)	Defibriniertes Blut: Erniedrigung des Gefrierpunktes (△)	Defibriniertes Blut: Hämatokrit (e)
1	50	—	—	37,5	klar, leicht rosenrot	150,9	1′ 32″2/5	0°,597	50
2	50	0,30′	0,18′	42	„	184,1	1′ 23″	0°,679	42,5
3	50	1,30′	1,18′	—	„	181,2	1′ 27″1/5	0°,678	45
4	50	2,30′	2,18′	35	„	179,3	1′ 27″2/5	0°,665	47
5	50	4,0′	3,48′	32	„	179,6	1′ 28″4/5	0°,653	48,5
6	50	6,0′	4,48′	45	„	178,1	1′ 29″	0°,649	51
7	50	8,0′	6,48′	35	„	178,3	1′ 29″	0°,663	51
8	50	24,10′	24,0′	—	leicht opalescent	179,8	1′ 27″	0°,658	—
	400						(Ausflußzeit des H_2O bei 37° C = 0′ 57″4/5)		

K_{37° der injizierten Lösung $1477{,}3 \times 10^{-4}$.
△ „ „ „ 5°,63.

Bei diesem Experiment wurde die Beobachtung bis zur 24. Stunde nach der Injektion fortgesetzt. Die Kurven der elektrischen Leitfähigkeit und des osmotischen Druckes stiegen nach der Injektion rasch an und erhielten sich auch längere Zeit hindurch auf einem viel höheren als dem Anfangsniveau.

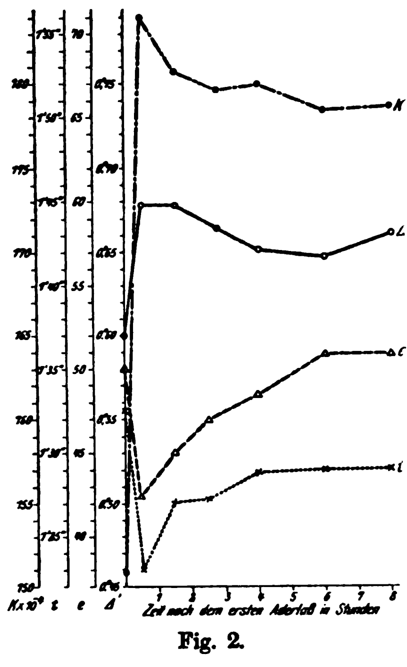


Fig. 2.

Die die Ausflußzeit darstellende Kurve und die aus den Werten des Hämatokriten erhaltene zeigen dagegen einen Verlauf, der im Gegensatz zu dem der vorigen steht; sie sinken nach der Injektion und steigen dann wieder langsam bis zur anfänglichen Höhe.

Die hämatokritischen Schwankungen und die der Ausflußzeit haben also die Tendenz, in einem Zeitraum zu verschwinden, der viel geringer ist als die Zeiträume, in denen die Schwankungen der elektrischen Leitfähigkeit und der molekularen Konzentration verschwinden.

4. Experiment. — 12. März 1908. — (Temperatur der Umgebung 13° C.)

♂ Hund von 24,750 kg Körpergewicht, der seit 15 Stunden hungert.

9h 25′	vormittags:	Das Tier uriniert aus eigenem Antriebe.
9h 30′	,,	Der linken A. femoralis werden 50 ccm Blut entnommen; davon lasse ich 40 ccm im geschlossenen Gefäß bei der Temperatur der Umgebung spontan gerinnen; die anderen 10 ccm werden defibriniert und ebenfalls im geschlossenen Gefäß und bei der Temperatur der Umgebung aufbewahrt.
10h 1′	,,	In die rechte V. femoralis werden 247,5 ccm einer 7 %igen NaCl-Lösung injiziert.
11h 5′	,,	Ende der Injektion.
11h 10′	,,	Der linken A. femoralis werden 50 ccm Blut entnommen und auf die erwähnte Weise aufbewahrt.
12h 0′	,,	Das Tier entleert eine große Menge Harn.

12h 30′ nachmittags: Entnahme von weiteren 50 ccm Blut.
2h 0′ „ Idem.
4h 0′ „ „
6h 0′ „ „

Dauer der Injektion: 1h 4′. — Pro Kilogramm des Tieres injizierte Flüssigkeit: 10,0 ccm. Pro Kilogramm und Minute 0,15 ccm. — Pro Kilogramm des Tieres 0,7 g NaCl.

Während des Experimentes wurde das Tier auf dem Fixierungsapparat gehalten. Am Morgen des 13. März wurden elektrische Leitfähigkeit und Ausflußzeit des aus den verschiedenen Blutproben gebildeten Serums bestimmt.

Das Blut, welches zur Kryoskopie und zu den hämatokritischen Bestimmungen dienen sollte, ging verloren.

Tabelle IV (4. Experiment).

Injektion: 7 %ige NaCl-Lösung.
ccm der injizierten Lösung pro Kilogramm Körpergewicht = 10,0.
g NaCl „ „ „ = 0,7.

Aderlaß	Blut ccm	Zeit nach dem ersten Aderlaß in Stunden	Zeit nach dem Ende der Injektion in Stunden	Blutserum			
				ccm Serum %Blut	Bemerkungen	Elektrische Leitfähigkeit ($K \times 10^{-4}$ 37° C)	Ausflußzeit bei 37° C (t)
1	50	—	—	12,5	leicht opalescent	150,8	1′ 18²/₅″
2	50	1,40′	0,5′	15	„	177,3	1′ 11″¹/₅
3	50	3,0 ′	1,25′	12,5	„	169,3	1′ 15″¹/₅
4	50	4,30′	2,55′	10	„	165,8	1′ 17″²/₅
5	50	6,30′	4,55′	10	„	163,8	1′ 15″⁴/₅
6	50	8,30′	6,55′	5	„	161,7	—
	300						(Ausflußzeit des H_2O bei 37° C = 0′ 50″²/₅

$K_{37°}$ der injizierten Lösung = $1128,3 \times 10^{-4}$.
$\triangle$ „ „ „ = 4°,22.

Die die Schwankungen der Viscosität darstellende Kurve ist bei diesem Experiment ähnlich der des vorhergehenden

Experimentes. Auch hier sinkt sie nach der Injektion und erhebt sich dann allmählich zur Höhe des bei Untersuchung des normalen Blutes erhaltenen Wertes.

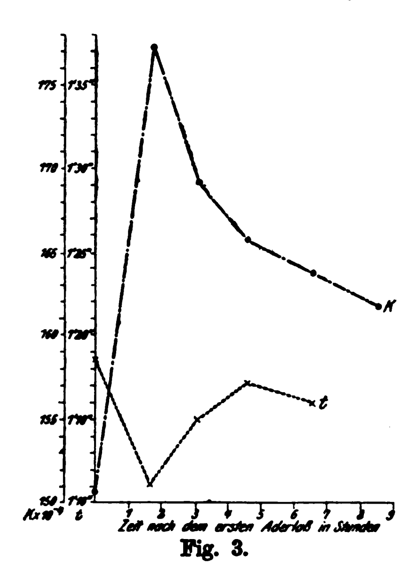


Fig. 3.

Dagegen zeigt die Kurve der elektrischen Leitfähigkeit einige Unterschiede: nach der raschen und starken anfänglichen Erhebung sinkt sie gegen die 8. Stunde fast um die Hälfte der Höhe, zu der sie gestiegen war. Bei diesem Experiment erfolgte die Injektion mit einer Geschwindigkeit, die weit geringer war als die beim vorhergehenden Experiment eingehaltene.

5. Experiment. — 24. Februar 1908 — (Temperatur der Umgebung 12° C.)

♂ Hund von 18,400 kg Körpergewicht, der seit 24 Stunden hungert.

10h 14′	vormittags:	Es werden 60 ccm Harn aufgefangen, die das Tier aus eigenem Antrieb entleert hat.
10h 15′	„	Der linken A. femoralis werden 50 ccm Blut entnommen: davon lasse ich 40 ccm im geschlossenen Gefäß bei der Temperatur der Umgebung spontan gerinnen; die anderen 10 ccm werden defibriniert und ebenfalls im geschlossenen Gefäß und bei der Temperatur der Umgebung aufbewahrt.
10h 29′	„	Injektion von 184 ccm einer 5 %igen NaCl-Lösung in die rechte V. femoralis.
10h 45′	„	Ende der Injektion.
11h 0′	„	Entnahme der 50 ccm Blut, die auf die oben beschriebene Weise aufbewahrt werden.
12h 30′	nachmittags:	Idem.
2h 0′	„	„
3h 0′	„	„
4h 30′	„	„

Tabelle V (5. Experiment).

Injektion: 5 %ige NaCl-Lösung.

ccm der injizierten Lösung pro Kilogramm Körpergewicht = 10,0.

g NaCl " " " = 0,5,

Aderlaß	Blut			Blut				Blut		Harn			
				Blutserum				Defibriniertes Blut					
	Blut ccm	Zeit nach dem ersten Aderlaß in Stunden	Zeit nach dem Ende der Injektion in Stunden	ccm Serum %Blut	Bemerkungen	Elektrische Leitfähigkeit (K×16⁻⁴ 37° C)	Ausflußzeit bei 37° C (t)	Erniedrigung des Gefrierpunktes (Δ)	Hämatokrit (e)	Harnprobe	Zeit nach dem Anfang der Injektion in Stunden	Elektrische Leitfähigkeit bei 37° C (K×10⁻⁴)	Erniedrigung des Gefrierpunktes (△)
1	50	—	—	35	klar	157,4	1′ 33″1/5	0°,598	48	1	—	217,1	1°,558
2	50	0,45′	0,15′	30	"	165,5	1′ 26″2/5	0°,620	43,5				
3	50	2,15′	1,45′	32	"	164,2	1′ 28″2/5	0°,620	44,5				
4	50	3,45′	3,15′	35	"	163,5	1′ 30″2/5	0°,618	47,5				
5	50	4,45′	4,15′	35	"	163,5	1′ 30″2/5	0°,618	48				
6	50	6,15′	5,45′	28	"	163,4	1′ 28″4/5	0°,608	—				
7	50	7,45′	7,15′	40	"	164,1	1′ 28″4/5	0°,618	—				
8	50	25,15′	24,15′	—	"	163,5	1′ 28″4/5	0°,598	—	2	25,0′	351,0	2°,858
	400						(Ausflußzeit des H_2O bei 37° C = 0′ 57″4/5)						

$K_{37°}$ der injizierten Lösung = 840,9×10⁻⁴.

△ " " " = 2°,890.

$6^h\,0'$ nachmittags: Item. Der Hund wird von dem Fixierungsapparat entfernt.

25. Februar

$11^h\,30'$ vormittags: Der Hund mußte während der Nacht hungern. Er hatte weder Harn noch Faeces entleert.

$11^h\,32'$ „ Entnahme einer gewissen Menge Harn, den das Tier spontan entleert hat.

Dauer der Injektion: $0^h\,16'$. — Pro Kilogramm des Tieres injizierte Flüssigkeit: 10,0 ccm; Pro Kilogramm und Minute: 0,63 ccm. Gramme NaCl pro Kilogramm des Tieres: 0,5.

Am Morgen des 25. Februar wurde die elektrische Leitfähigkeit und die Ausflußzeit des von den verschiedenen Blutproben gebildeten Serums ermittelt, ferner der Gefrierpunkt und das Blutkörperchenvolum des defibrinierten Blutes. Gleichzeitig wurden elektrische Leitfähigkeit und Gefrierpunkt des vor und nach dem Experiment aufgefangenen Harns bestimmt.

Die erhaltenen Werte sind in der Tabelle V Seite 413 zusammengefaßt:

Obschon bei diesem Experiment die Schwankungen der elektrischen Leitfähigkeit und der molekularen Konzentration viel größer sind als die beim 3. Experiment erhaltenen, so ist doch die allgemeine Richtung der Kurven bei beiden Experimenten nicht sehr verschieden. Auch hier steigen sie an im Augenblick der Injektion und erhalten sich dann auf einer langen Strecke, bis zur 8. Stunde, auf einer größeren Höhe als das Anfangsniveau; die Ähnlichkeit ist jedoch größer zwischen den Kurven der elektrischen Leitfähigkeit.

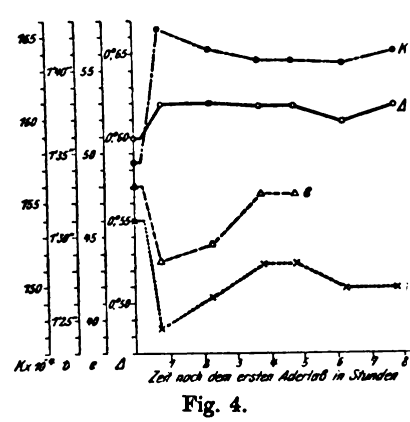


Fig. 4.

Die Richtung der Kurve der Ausflußzeit und der sich auf die hämatokritischen Bestimmungen beziehenden Kurve sind bei diesem Experiment gleich denen der vorhergehenden

Experimente. Aus der Tabelle ersieht man ferner, daß die molekulare Konzentration des Blutes nach 24 Stunden den normalen Wert erreicht hat, während die elektrische Leitfähigkeit eine hohe bleibt, obgleich der Gehalt an Salzen in dem vom Tiere entleerten Harn zugenommen hat, wie sich aus den an letzterem vorgenommenen Untersuchungen bezüglich der elektrischen Leitfähigkeit und des osmotischen Druckes ergibt.

Die Viscosität des Serums ist noch nach 24 Stunden, wie bei dem vorigen Experiment, geringer als die normale; diese Erscheinung läuft parallel mit der andauernden Erhöhung der elektrischen Leitfähigkeit.

6. Experiment. — 25. März 1908. — (Temperatur der Umgebung 14° C.)

♂ Hund, 22,900 kg Körpergewicht, hungert seit 24 Stunden.

$9^h\,43'$ vormittags: Der linken A. femoralis werden 50 ccm Blut entnommen: 40 ccm davon lasse ich im geschlossenen Gefäß bei der Temperatur der Umgebung spontan gerinnen; die übrigen 10 ccm werden defibriniert und ebenfalls im geschlossenen Gefäß und bei der Temperatur der Umgebung aufbewahrt.

$9^h\,50'$ vormittags: In die rechte V. femoralis werden 229 ccm einer 5%igen NaCl-Lösung injiziert.

$10^h\,50'$ „ Ende der Injektion.

$11^h\,0'$ „ Entnahme von weiteren 50 ccm Blut, die auf die erwähnte Weise aufbewahrt werden.

12^h „ Idem.

$1^h\,30'$ nachmittags: „

$3^h\,0'$ „ „

$5^h\,0'$ „ „

$6^h\,0'$ „ „

Während des Experimentes hat das auf dem Fixierungsapparat unbeweglich liegende Tier weder Harn noch Faeces entleert.

Dauer der Injektion: $1^h\,0'$. — Pro Kilogramm des Tieres injizierte Flüssigkeit: 10,0 ccm. Pro Kilogramm und Minute: 0,16 ccm. Pro Kilogramm des Tieres NaCl: 0,5 g.

Am Morgen des 26. März werden bestimmt: die elektrische Leitfähigkeit und die Ausflußzeit des aus den verschiedenen Blutproben gebildeten Serums, der Gefrierpunkt und das Blutkörperchenvolum des defibrinierten Blutes. Die Werte sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Tabelle VI (6. Experiment).

Injektion: 5 %ige NaCl-Lösung.

ccm der injizierten Lösung pro Kilogramm Körpergewicht = 10,0.
g NaCl „ „ „ = 0,5.

Aderlaß	Blut ccm	Zeit nach dem ersten Aderlaß in Stunden	Zeit nach dem Ende der Injektion in Stunden	Blutserum: ccm Serum %Blut	Blutserum: Bemerkungen	Blutserum: Elektrische Leitfähigkeit (K × 10⁻⁴ 37° C)	Blutserum: Ausflußzeit bei 37° C (t)	Defibriniertes Blut: Erniedrigung des Gefrierpunktes (Δ)	Defibriniertes Blut: Hämatokrit (e)
1	50	—	—	40	klar	152,4	1′ 16″	0°,610	37
2	50	1,20′	0,10′	40	„	168,4	1′ 7″	0°,650	33
3	50	2,20′	1,10′	45	„	165,4	1′ 10″	0°,650	35
4	50	3,50′	2,40′	41	„	164,9	1′ 11″	0°,650	35
5	50	5,20′	4,10′	—	leicht rosenrot	159,7?	—	0°,660	35
6	50	7,20′	6,10′	50	„	163,5	1′ 11″	0°,640	35
7	50	8,20′	7,10′	—	„	162,5	1′ 11″ 1/5	0°,640	34
	350						(Ausflußzeit des H_2O bei 37° C = 0′ 50″ 2/5)		

$K_{37°}$ der injizierten Lösung = $840{,}9 \times 10^{-4}$.
Δ „ „ „ = 2°,890.

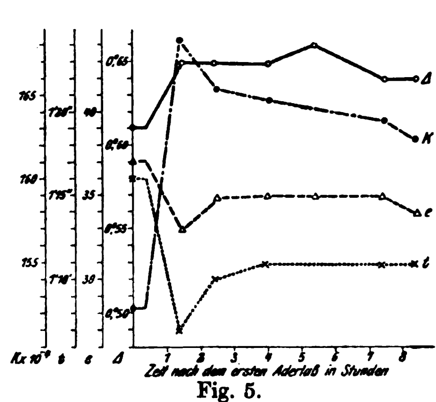


Fig. 5.

Aus den bei diesem Experiment ausgeführten Bestimmungen ergibt sich, daß die Schwankungen der physiko-chemischen Eigenschaften des Blutes bis zur 7. Stunde nach der Injektion mit denen identisch sind, die beim vorigen Experiment beobachtet wurden; bei letzterem

wurde pro Kilogramm des Tieres dieselbe Menge Salz in einem gleichen Volum Flüssigkeit, aber während einer längeren Zeit injiziert.

7. Experiment. — 28. Februar 1908. — (Temperatur der Umgebung 11° C.)

♂ Hund von 19,500 kg Körpergewicht, der seit 15 Stunden hungert.

9h 30′ vormittags:	Der linken A. femoralis werden 50 ccm Blut entnommen: davon lasse ich 40 ccm im geschlossenen Gefäß und bei der Temperatur der Umgebung spontan gerinnen; die übrigen 10 ccm werden defibriniert und gleichfalls im geschlossenen Gefäß und bei der Temperatur der Umgebung aufbewahrt.
9h 50′ vormittags	In die linke V. femoralis werden 195 ccm einer 3%igen NaCl-Lösung injiziert.
10h 5′ „	Ende der Injektion.
10h 30′ „	Es werden weitere 50 ccm Blut entnommen und auf die erwähnte Weise aufbewahrt.
11h 0′ „	Idem.
12h 30′ nachmittags:	„
2h 0′ „	„
4h 0′ „	„
6h 0′ „	„

Dauer der Injektion: 0h 15′. Pro Kilogramm des Tieres injizierte Flüssigkeit: 10,0 ccm — Pro Kilogramm und Minute: 0,66 ccm, — Pro Kilogramm des Tieres NaCl: 0,3 g.

Während des Experimentes hatte das auf dem Fixierungsapparat unbeweglich liegende Tier weder Harn noch Faeces entleert.

Am Morgen des 29. Februar erfolgte die Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit und der Ausflußzeit des durch die verschiedenen Proben des geronnenen Blutes gebildeten Serums; ferner wurden bestimmt der Gefrierpunkt und das Blutkörperchenvolum des defibrinierten Blutes. Die erhaltenen Werte sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Tabelle VII. (7. Experiment).

Injektion: 3 %ige NaCl-Lösung.

ccm der injizierten Lösung pro Kilogramm Körpergewicht = 10,0.
g NaCl " " " = 0,3.

Aderlaß	Blut ccm	Zeit nach dem ersten Aderlaß in Stunden	Zeit nach dem Ende der Injektion in Stunden	Blutserum: ccm Serum % Blut	Blutserum: Bemerkungen	Blutserum: Elektrische Leitfähigkeit ($K \times 10^{-4}$ 37° C)	Blutserum: Ausflußzeit bei 37° C (t)	Defibriniertes Blut: Erniedrigung des Gefrierpunktes (Δ)	Defibriniertes Blut: Hämatokrit (e)
1	50	—	—	40	klar	155,1	1′ 16″	0°,578	30,5
2	50	0,40′	0,5	45	"	172,5	1′ 10″ ²/₅	0°,599	26
3	50	1,30′	0,55′	42	"	166,6	1′ 14″	0°,598	25
4	50	3,0′	2,25′	48	"	159,1	1′ 14″	0°,618	28
5	50	4,30′	3,55′	39	leicht rosenrot	159,7	1′ 13″ ²/₅	0°,628	28
6	50	6,30′	5,55′	39	farblos	160,2	1′ 14″ ¹/₅	0°,628	28
7	50	8,30′	7,55′	40	"	159,1	1′ 15″	0°,618	28
	350						(Ausflußzeit des H_2O bei 37° C = 0′ 50″ ²/₅)		

$K^{37°}$ der injizierten Lösung = $546,9 \times 10^{-4}$.
Δ " " " = 1°,77.

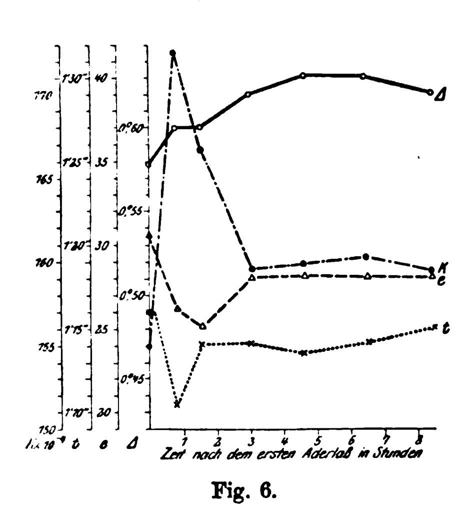


Fig. 6.

Acht Stunden nach der Injektion von 3 %igem NaCl sind die physikochemischen Merkmale des Blutes noch nicht wieder normal geworden. Die Schwankungen der molekularen Konzentration und des Blutkörperchenvolums können als den der zwei letzten geschilderten Experimente analog betrachtet werden. Dagegen sinkt die elektrische Leitfähigkeit bedeutend nach der entsprechend der Injektion eintretenden konstanten Erhöhung, mehr als bis jetzt beobachtet wurde, während parallel damit

die Ausflußzeit zunimmt, bis sie in der 8. Stunde fast den Anfangswert erreicht.

Rohrzucker.

8. Experiment. — 14. Mai 1908. — (Temperatur der Umgebung 18° C.)

♂ Hund von 19,450 kg Körpergewicht, der seit 24 Stunden hungert.

$10^h 0'$	vormittags:	Der linken A. femoralis werden 50 ccm Blut entzogen: 40 ccm lasse ich im geschlossenen Gefäß bei einer Temperatur von 5 bis 6° C spontan gerinnen; die übrigen 10 ccm werden defibriniert und ebenfalls im geschlossenen Gefäß bei der Temperatur von 5 bis 6° C aufbewahrt.
$10^h 9'$	„	In die linke V. femoralis werden 189 ccm einer $46,7\,^0/_0$igen Rohrzuckerlösung injiziert, die einer $8\,^0/_0$igen NaCl-Lösung äquimolekular ist.
$10^h 30'$	„	Ende der Injektion.
$10^h 40'$	„	Der linken A. femoralis werden weitere 50 ccm Blut entzogen und auf die erwähnte Weise aufbewahrt.
$12^h 0'$	„	Idem.
$12^h 45'$	nachmittags:	Das Tier entleert eine sehr reichliche Menge Harn.
$1^h 30'$	„	Entnahme von weiteren 50 ccm Blut.
$3^h 0'$	„	Idem.
$5^h 0'$	„	„

Dauer der Injektion: $0^h 21'$. — Kubikzentimeter der injizierten Lösung pro Kilogramm des Tieres: 9,7. — Pro Kilogramm und Minute: 0,46 ccm. — Gramme Rohrzucker pro Kilogramm des Tieres: 4,53.

Am Morgen des 15. Mai bestimmte ich die elektrische Leitfähigkeit und die Ausflußzeit des aus den verschiedenen Proben von Blut, das ich spontan gerinnen ließ, gebildeten Serums, den Gefrierpunkt und das Blutkörperchenvolum des defibrinierten Blutes. Die Werte sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Tabelle VIII (8. Experiment).

Injektion: 46,7 %ige Rohrzuckerlösung.

ccm der injizierten Lösung pro Kilogramm Körpergewicht = 9,7.
g Zucker „ „ „ = 4,53.

Aderlaß	Blut ccm	Zeit nach dem ersten Aderlaß in Stunden	Zeit nach dem Ende der Injektion in Stunden	Blutserum: ccm Serum % Blut	Blutserum: Bemerkungen	Blutserum: Elektrische Leitfähigkeit ($K \times 10^{-4}$ 37° C)	Blutserum: Ausflußzeit bei 37° C (t)	Defibriniertes Blut: Erniedrigung des Gefrierpunktes (Δ)	Defibriniertes Blut: Hämatokrit (e
1	50	—	—	30	klar, farblos	154,2	3′ 1″1/5	0°,578	29
2	50	0,40′	0,10′	30	„	143,7	2′ 40″	0°,618	23
3	50	2,0′	1,30′	35	„	148,6	3′ 2″2/5	0°,618	33
4	50	3,30′	3,0′	35	„	153,6	3′ 2″1/5	0°,618	33
5	50	5,0′	4,30′	40	„	154,1	3′ 2″2/5	0°,618	30
6	50	7,0′	6,30′	45	„	155,8	—	0°,618	30
	300						(Ausflußzeit des H_2O bei 37° C = 1′ 53″)		

△ der injizierten Lösung = 4°,52.

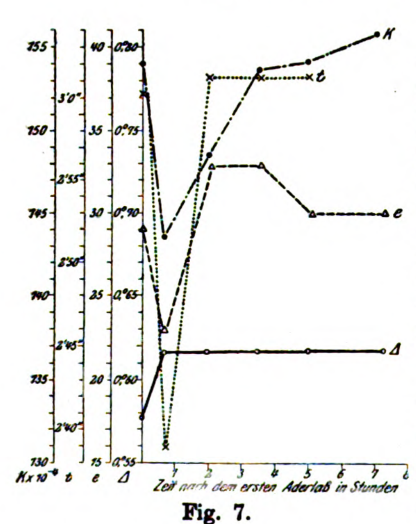


Fig. 7.

Aus diesem Experiment ersieht man, daß die physikochemischen Schwankungen des Blutes nach Injektion einer hypertonischen (46 %igen) Rohrzuckerlösung sehr verschieden von denen sind, die wir beim Experimentieren mit hypertonischen NaCl-Lösungen konstatiert haben.

Mit Ausnahme der Kurve der molekularen Konzentration, die bis nach der 6. Stunde stets hoch bleibt, zeigen die anderen Kurven einen gemeinsamen Charakter, und auf das sogleich nach der Injektion beobachtete Fallen folgt ein rasches und andauerndes Steigen bis über den normalen Wert.

Die Schwankungen der elektrischen Leitfähigkeit des Blutserums erfolgen in entgegengesetztem Sinne zu denen, die konstant beim Chlornatrium beobachtet worden sind.

9. Experiment. — 4. Mai 1908. — (Temperatur der Umgebung 16° C.)

♂ Hund, 20,250 kg schwer, hungert seit 24 Stunden.

9h 40′ vormittags:	Der linken A. femoralis werden 50 ccm Blut entnommen: 40 ccm lasse ich im geschlossenen Gefäß bei der Temperatur der Umgebung spontan gerinnen; die übrigen 10 ccm werden defibriniert und ebenfalls im geschlossenen Gefäß und bei der Temperatur der Umgebung aufbewahrt.
9h 44′ „	In die linke V. femoralis werden 202 ccm einer 29,2°/₀igen Rohrzuckerlösung injiziert, die einer 5°/₀igen NaCl-Lösung äquimolekular ist.
9h 53′ „	Ende der Injektion.
10h 0′ „	Der linken A. femoralis werden weitere 50 ccm Blut entnommen und auf die erwähnte Weise aufbewahrt.
11h 30′ „	Idem.
1h 0′ nachmittags:	„
3h 0′ „	„
5h 30′ „	„

Dauer der Injektion: 0h 9′. — Kubikzentimeter der pro Kilogramm des Tieres injizierten Lösung: 10,0. — Pro Kilogramm und Minute: 1,11 ccm. — Gramme Rohrzucker pro Kilogramm des Tieres: 2,92.

Während des Experimentes hat das auf dem Fixierungsapparat unbeweglich liegende Tier weder Harn noch Faeces entleert.

Am Morgen des 5. Mai bestimme ich die elektrische Leitfähigkeit und die Ausflußzeit des aus dem spontan geronnenen Blute gebildeten Serums, den Gefrierpunkt und das Blutkörchenvolum des defibrinierten Blutes.

Die Werte sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Tabelle IX (9. Experiment).

Injektion: 29,2%ige Rohrzuckerlösung.

ccm der injizierten Lösung pro Kilogramm Körpergewicht = 10,0.
g Zucker „ „ „ = 2,92.

Aderlaß	Blut ccm	Zeit nach dem ersten Aderlaß in Stunden	Zeit nach dem Ende der Injektion in Stunden	Blutserum: ccm Serum % Blut	Blutserum: Bemerkungen	Blutserum: Elektrische Leitfähigkeit ($K \times 10^{-4}$ 37° C)	Blutserum: Ausflußzeit bei 37° C (t)	Defibriniertes Blut: Erniedrigung des Gefrierpunktes (Δ)	Defibriniertes Blut: Hämatokrit (e)
1	50	—	—	31	klar, farblos	149,2	1′ 42″2/5	0°,578	43,5
2	50	0,20′	0,7′	35	„	139,4	1′ 32″1/5	0°,608	35
3	50	1,50′	1,37′	35	„	146,8	1′ 43″2/5	0°,568	45
4	50	3,20′	3,7′	38	„	150,2	1′ 44″4/5	0°,578	45
5	50	5,20′	5,7′	36	leicht opalescent	151,3	1′ 44″	0°,578	45
6	50	7,50′	7,7′	39	„	151,4	1′ 43″	0°,578	44
	300						(Ausflußzeit des H_2O bei 37° C = 1′ 9″1/10)		

Δ der injizierten Lösung = 2°,28.

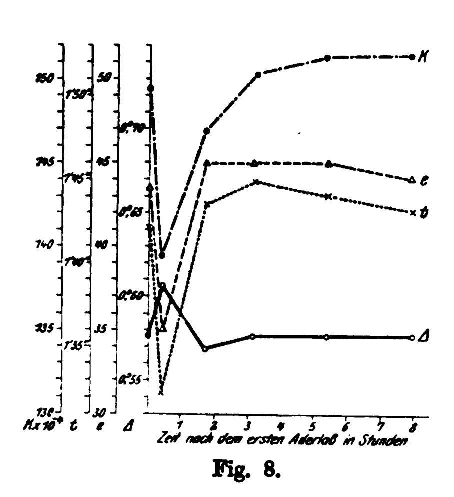


Fig. 8.

Bei diesem Experiment, bei dem eine 29%ige Rohrzuckerlösung injiziert wurde, waren beim Blute Schwankungen derselben Art, jedoch weniger deutlich ausgeprägt, zu bemerken wie beim vorhergehenden Experiment. Der osmotische Druck erreichte nach einer leichten Erhöhung sehr bald den normalen Wert.

Injektion einer isotonischen Lösung.

Chlornatrium.

10. Experiment. — 10. April 1908. — (Temperatur der Umgebung 13° C.)

♂ Hund von 15,200 kg Gewicht. Das Tier hat um 7 Uhr morgens gefressen.

$9^h 7'$	vormittags:	Der rechten A. femoralis werden 50 ccm Blut entnommen: 40 ccm lasse ich im geschlossenen Gefäß und bei der Temperatur der Umgebung spontan gerinnen, die übrigen 10 ccm werden defibriniert und ebenfalls im geschlossenen Gefäß und bei der Temperatur der Umgebung aufbewahrt.
$9^h 15'$	„	Injektion von 152 ccm einer 0,90 °/₀ igen NaCl-Lösung in die linke V. femoralis.
$9^h 22'$	„	Ende der Injektion.
$9^h 25'$	„	Weitere 50 ccm Blut werden entnommen und auf die erwähnte Weise aufbewahrt.
$10^h 30'$	„	Idem.
$12^h 0'$	„	„
$2^h 0'$	nachmittags:	„
$4^h 0'$	„	„
$6^h 0'$	„	„

Dauer der Injektion: $0^h 7'$. — Kubikzentimeter der pro Kilogramm des Tieres injizierten Lösung: 10,0. — Pro Kilogramm und Minute: 1,43. — Gramm NaCl pro Kilogramm des Tieres: 0,09.

Während des Experimentes hat das Tier weder Harn noch Faeces entleert.

Am Morgen des 11. April bestimme ich die elektrische Leitfähigkeit und die Ausflußzeit des aus den verschiedenen Proben spontan geronnenen Blutes gebildeten Serums, den Gefrierpunkt und das Blutkörperchenvolum des defibrinierten Blutes.

Die erhaltenen Werte sind in der folgenden Tabelle vereinigt:

Tabelle X (10. Experiment).

Injektion: 0,90 %ige NaCl-Lösung.

ccm der injizierten Lösung pro Kilogramm Körpergewicht = 10,0.

g NaCl " " " = 0,09.

Aderlaß	Blut ccm	Zeit nach dem ersten Aderlaß in Stunden	Zeit nach dem Ende der Injektion in Stunden	Blutserum: ccm Serum % Blut	Blutserum: Bemerkungen	Blutserum: Elektrische Leitfähigkeit (K×10⁻⁴ 37° C)	Blutserum: Ausflußzeit bei 37° C (t)	Defibriniertes Blut: Erniedrigung des Gefrierpunktes (△)	Defibriniertes Blut: Hämatokrit (e)
1	50	—	—	22	klar	152,7	1′ 50″1/5	0°,580	36
2	50	0,18′	0,3′	32	"	152,0	1′ 44″3/5	0°,580	33
3	50	1,23′	1,8′	30	"	152,0	1′ 46″	0°,575	33
4	50	2,53′	2,38′	35	"	155,6	1′ 50″1/5	0°,575	32
5	50	4,53′	4,38′	38	"	154,7	1′ 49″4/5	0°,540	33
6	50	6,53′	6,38′	32	"	154,5	—	0°,555	33,5
7	50	8,53′	8,38′	35	"	155,4	1′ 51″	0°,575	34
	350						(Ausflußzeit des H_2O bei 37° C = 1′ 9″1/10)		

$K_{37°}$ der injizierten Lösung = 213,8 × 10⁻⁴.

△ " " " = 0°,55.

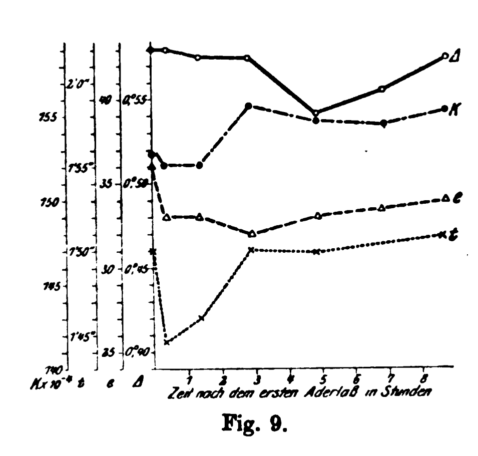


Fig. 9.

Aus diesem Experiment, das mit einer dem Blut ungefähr isotonischen Lösung gemacht wurde, ersieht man, daß die molekulare Konzentration gegen die 5. Stunde etwas vermindert ist, dann aber wieder bis zum Anfangswert steigt; ferner ersieht man, daß das Blutkörperchenvolum auch 8 Stunden nach der Injektion geringer ist als der normale Wert, während die Viscosität vor der 3. Stunde schon wieder die gleiche wie zu Beginn des Experimentes geworden ist.

Injektion von hypotonischen Lösungen.

Rohrzucker.

11. Experiment. — 13. April 1908. — (Temperatur der Umgebung 14° C.)

♂ Hund von 18,650 kg Gewicht, der seit 24 Stunden hungert. Das Tier hat schon zum 6. Experiment (25. März 1908) gedient.

$9^h 20'$ vormittags:	Der rechten A. femoralis werden 50 ccm Blut entnommen: 40 ccm lasse ich im geschlossenen Gefäß und bei der Temperatur der Umgebung spontan gerinnen; die übrigen 10 ccm werden defibriniert und ebenfalls im geschlossenen Gefäß und bei der Temperatur der Umgebung aufbewahrt.
$9^h 39'$,,	In die linke V. femoralis werden 186 ccm einer 5°/₀igen Rohrzuckerlösung injiziert, die einer 0,85°/₀igen NaCl-Lösung äquimolekular ist.
$9^h 46'$,,	Ende der Injektion.
$9^h 50'$,,	Weitere 50 ccm Blut werden aufgefangen und auf die gewöhnliche Weise aufbewahrt.
$11^h 0'$,,	Idem.
$12^h 30'$ nachmittags:	,,
$2^h 0'$,,	,,
$4^h 0'$,,	,,
$6^h 0'$,,	,,

Dauer der Injektion: $0^h 7'$. — Kubikzentimeter der pro Kilogramm des Tieres injizierten Flüssigkeit: 10,0. — Pro Kilogramm und Minute: 1,43 ccm. — Gramm Rohrzucker pro Kilogramm des Tieres: 0,5.

Während des Experiments hat das Tier weder Harn noch Faeces entleert.

Am Morgen des 14. April bestimmte ich die elektrische Leitfähigkeit und die Ausflußzeit des aus den verschiedenen Proben von spontan geronnenem Blut gesammelten Serums; ferner bestimmte ich den Gefrierpunkt und das Blutkörperchenvolum des defibrinierten Blutes.

Die erhaltenen Werte sind in der folgenden Tabelle verzeichnet:

Tabelle XI (11. Experiment).

Injektion: 5 %ige Rohrzuckerlösung.

ccm der injizierten Lösung pro Kilogramm Körpergewicht = 10,0.

g Zucker " " " = 0,5.

Aderlaß	Blut ccm	Zeit nach dem ersten Aderlaß in Stunden	Zeit nach dem Ende des Aderlasses in Stunden	Blutserum: ccm Serum %Blut	Blutserum: Bemerkungen	Blutserum: Elektrische Leitfähigkeit (K×15⁻⁴ 37° C)	Blutserum: Ausflußzeit bei 37° C (t)	Defibriniertes Blut: Erniedrigung des Gefrierpunktes (Δ)	Defibriniertes Blut: Hämatokrit (e)
1	50	—	—	39	leicht opalescent	152,1	2′ 0 2/5″	0°,578	38
2	50	0,30′	0,4′	25	"	146,1	1′ 52 1/5″	0°,563	33
3	50	1,40′	1,14′	38	"	147,4	1′ 57″	0°,563	34
4	50	3,10′	2,44′	38	"	147,4	1′ 57 4/5″	0°,550	34
5	50	4,40′	4,14′	40	"	151,0	1′ 53 3/5″	0°,550	34,5
6	50	6,40′	6,14′	40	"	—	1′ 55″	0°,550	34,5
7	50	8,40′	8,14′	42	"	149,0	1′ 55 4/5″	0°,558	35
	350						(Ausflußzeit des H_2O bei 37° C = 1′ 9 1/10″)		

△ der injizierten Lösung = 0°,36.

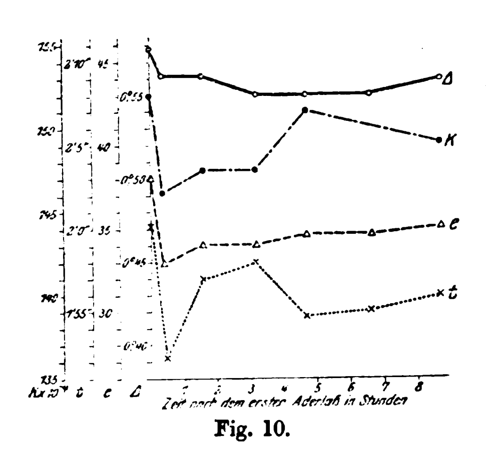


Fig. 10.

Vergleicht man die Kurven dieses Experiments mit denen des vorhergehenden, so bemerkt man sehr wenig Unterschiede. Die Kurven der elektrischen Leitfähigkeit und der Ausflußzeit bleiben eine etwas längere Zeit hindurch nach der Injektion unter der Anfangshöhe.

Trinkwasser.

12. Experiment. — 31. Januar 1908. — (Temperatur der Umgebung 13° C.)

♂ Hund, 20,180 kg schwer, hungert seit 15 Stunden.

$10^h 20'$ vormittags:	Der linken A. femoralis werden 50 ccm Blut entnommen: 40 ccm lasse ich im geschlossenen Gefäß und bei der Temperatur der Umgebung spontan gerinnen; die übrigen 10 ccm werden defibriniert und ebenfalls im geschlossenen Gefäß und bei der Temperatur der Umgebung aufbewahrt.
$10^h 31'$ „	In die rechte V. femoralis werden 201 ccm Trinkwasser injiziert.
$10^h 47'$ „	Ende der Injektion.
$11^h 15'$ „	Es werden weitere 50 ccm Blut aufgefangen und auf die erwähnte Weise aufbewahrt.
$12^h 0'$ „	Idem.
$1^h 0'$ nachmittags	„
$2^h 20'$ „	„
$4^h 20'$ „	„
$6^h 20'$ „	„

Dauer der Injektion: $0^h 16'$. — Kubikzentimeter der pro Kilogramm des Tieres injizierten Flüssigkeit: 10,0. — Pro Kilogramm und Minute: 0,63 ccm.

Während des Experiments hat das Tier weder Harn noch Faeces entleert.

Am Morgen des 1. Februar bestimmte ich die elektrische Leitfähigkeit und die Ausflußzeit des aus den verschiedenen Proben von spontan geronnenem Blut gebildeten Serums; ferner bestimmte ich den Gefrierpunkt und das Blutkörperchenvolum des defibrinierten Blutes.

Die Werte sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Tabelle XII (12. Experiment).

Injektion: Trinkwasser.

ccm pro Kilogramm Körpergewicht = 10,0.

Aderlaß	Blut	Zeit nach dem ersten Aderlaß in Stunden	Zeit nach dem Ende des Aderlasses in Stunden	Blutserum				Defibriniertes Blut	
	ccm			ccm Serum %/Blut	Bemerkungen	Elektrische Leitfähigkeit ($K \times 10^{-4}$ 37° C)	Ausflußzeit bei 37° C (t)	Erniedrigung des Gefrierpunktes (Δ)	Hämatokrit (e)
1	50	—	—	21	klar	151,0	1' 34" 2/5	0°,570	43
2	50	0,55'	0,28'	25	klar rosenrot	149,3	1' 35" 1/5	0°,558	46
3	50	1.40'	1,13'	27	"	147,8	1' 33" 1/5	0°,558	48
4	50	2,40'	2,13'	25	"	148,3	1' 33" 2/5	0°,566	48,5
5	50	4,0'	3,33'	25	"	148,0	1' 34"	0°,593	48,5
6	50	6,0'	5,33'	26	"	148,9	1' 32" 2/5	0°,580	48
7	50	8,0'	7,33'	25	"	147,8	1' 33"	0°,568	44,5
	350						(Ausflußzeit des H_2O bei 37° C = 0' 57" 4/5)		

$K_{37°}$ des injizierten Wassers $= 4,1 \times 10^{-4}$.

Δ " " " = 0°,005.

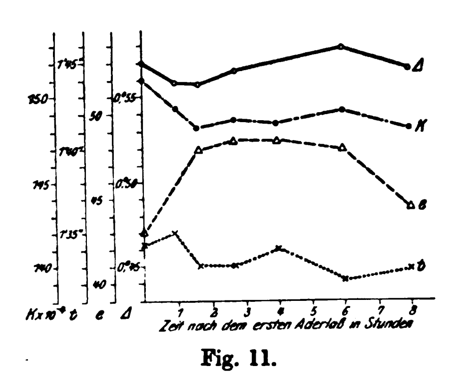


Fig. 11.

Die Resultate dieses Experiments beweisen, daß die physiko-chemischen Schwankungen des Blutes nach der Injektion einer stark hypotonischen Lösung sehr unbedeutend sind; die größte Abweichung zeigt die Kurve des Hämatokriten, die nach der Injektion progressiv ansteigt, um erst nach der 8. Stunde zur Anfangshöhe zurückzukehren.

Ferner zeigt keine von den Kurven irgendeine ausgesprochene Abweichung, die der Injektion entsprechen würde.

13. Experiment. — 28. März 1908. — (Temperatur der Umgebung 18° C.)

♀ Hund von 22,750 kg Körpergewicht, der seit 24 Stunden hungert. Das Tier hat schon zum 4. Experiment (12. März 1908) gedient.

9h 15′	vormittags:	Der rechten A. femoralis werden 50 ccm Blut entnommen: 40 ccm lasse ich im geschlossenen Gefäß bei der Temperatur der Umgebung spontan gerinnen; die anderen 10 ccm werden defibriniert und ebenfalls im geschlossenen Gefäß und bei der Temperatur der Umgebung aufbewahrt.
9h 20′	„	In die linke V. femoralis werden 227 ccm Trinkwasser injiziert.
9h 29′	„	Ende der Injektion.
9h 34′	„	Weitere 50 ccm Blut werden entnommen und auf die erwähnte Weise aufbewahrt.
10h 30′	„	Idem.
12h 0′	„	„
1h 30′	nachmittags	„
3h 0′	„	„
5h 0′	„	„

Dauer der Injektion: 0h 9′. — Kubikzentimeter der pro Kilogramm des Tieres injizierten Flüssigkeit: 10,0. — Pro Kilogramm und Minute: 1,11 ccm.

Während des Experiments hat das Tier weder Harn noch Faeces entleert.

Am Morgen des 29. März bestimmte ich die elektrische Leitfähigkeit und die Ausflußzeit des aus den verschiedenen Proben von spontan geronnenem Blut gebildeten Serums, den Gefrierpunkt und das Blutkörperchenvolum des defibrinierten Blutes.

Die erhaltenen Werte sind in der folgenden Tabelle eingetragen:

Tabelle XIII (13. Experiment).

Injektion: Trinkwasser.

ccm pro Kilogramm Körpergewicht = 10,0.

Aderlaß	Blut	Zeit nach dem ersten Aderlaß in Stunden	Zeit nach dem Ende des Aderlasses in Stunden	Blutserum				Defibriniertes Blut	
	ccm			ccm Serum %Blut	Bemerkungen	Elektrische Leitfähigkeit ($K \times 10^{-4}$ 37° C)	Ausflußzeit bei 37° C (t)	Erniedrigung des Gefrierpunktes (Δ)	Hämatokrit (e)
1	50	—	—	50	klar farblos	152,0	1′ 16″3/5	0°,577	57
2	50	0,19′	0,5′	50	klar rosenrot	148,7	1′ 14″	0°,592	58
3	50	1,15′	1,1′	54	„	150,5	1′ 14″1/5	0°,582	59
4	50	2,45′	2,30′	45	„	148,7	1′ 14″1/5	0°,590	59
5	50	4,15′	4,0′	35	„	150,4	1′ 13″	0°,580	59
6	50	9,45′	5,30′	58	leicht rosenrot	150,8	1′ 13″1/5	0°,570	58
7	50	7,45′	7,30′	53	„	150,4	1′ 12″	0°,540	57,5
	350						(Ausflußzeit des H_2O bei 37° C = 0′ 50″2/5)		

K_{37° des injizierten Wassers = $4,1 \times 10^{-4}$.

Δ „ „ „ = 0°,005.

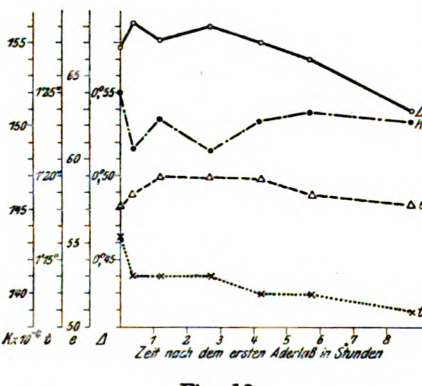


Fig. 12.

Die Resultate dieses mit Trinkwasser gemachten Experiments bestätigen durchaus die Ergebnisse des vorigen, bei dem dieselbe Flüssigkeit in gleicher Menge pro Kilogramm des Tieres, aber in fast der doppelten Zeit injiziert wurde. Der einzige Unterschied ist, daß die Steigung der hämato-

kritischen Kurve weniger ausgeprägt ist, sowie daß die Kurve der molekularen Konzentration zuerst ansteigt, dann gegen die 7. oder 8. Stunde unbedeutend sinkt.

Das aus den verschiedenen Blutproben stammende, nach der Injektion entnommene Serum ist stark lackfarben.

14. Experiment. — 5. März 1908. — (Temperatur der Umgebung 12° C.)

♂ Hund, 18,100 kg Körpergewicht, hungert seit 15 Stunden.

$9^h\,10'$	vormittags:	Der linken A. femoralis werden 50 ccm Blut entnommen: 40 ccm lasse ich im geschlossenen Gefäß bei der Temperatur der Umgebung spontan gerinnen; die anderen 10 ccm werden defibriniert und ebenfalls im geschlossenen Gefäß und bei der Temperatur der Umgebung aufbewahrt.
$9^h\,13'$	„	In die linke V. femoralis werden 362 ccm Trinkwasser injiziert.
$9^h\,25'$	„	Ende der Injektion.
$9^h\,30'$	„	Weitere 50 ccm Blut werden aufgefangen und auf die geschilderte Weise aufbewahrt.
$10^h\,30'$	„	Idem.
$12^h\,0'$	„	„
$2^h\,0'$	nachmittags	„
$4^h\,0'$	„	„
$6^h\,0'$	„	„

Dauer der Injektion: $0^h\,12'$. — Kubikzentimeter der pro Kilogramm des Tieres injizierten Flüssigkeit: 20,0. — Pro Kilogramm und Minute: 1,66 ccm.

Während der Injektion hat das Tier weder Harn noch Faeces entleert.

Am Morgen des 6. März wurden bestimmt: die elektrische Leitfähigkeit und die Ausflußzeit des aus den verschiedenen Proben des geronnenen Blutes gebildeten Serums, der Gefrierpunkt und das Blutkörperchenvolum des defibrinierten Blutes.

Die Werte sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Tabelle XIV (14. Experiment).

Injektion: Trinkwasser.

ccm pro Kilogramm Körpergewicht = 20,0.

Aderlaß	Blut ccm	Zeit nach dem ersten Aderlaß in Stunden	Zeit nach dem Ende des Aderlasses in Stunden	Blutserum: ccm Serum % Blut	Blutserum: Bemerkungen	Blutserum: Elektrische Leitfähigkeit ($K \times 10^{-4}$ 37° C)	Blutserum: Ausflußzeit bei 37° C (t)	Defibriniertes Blut: Erniedrigung des Gefrierpunktes (Δ)	Defibriniertes Blut: Hämatokrit (e)
1	50	—	—	50	klar farblos	157,4	1' 16"	0°,578	28
2	50	0,20'	0,5'	50	klar rosenrot	153,9	1' 12" 4/5	0°,561	21
3	50	1,20'	1,5'	55	„	152,4	1' 15" 4/5	0°,584	22
4	50	2,50'	2,35'	45	„	153,7	1' 15" 4/5	0°,578	22,4
5	50	4,50'	4,35'	35	leicht rosenrot	153,4	1' 15" 4/5	0°,578	22,8
6	50	6,50'	6,35'	55	„	153,7	1' 15" 2/5	0°,578 (?)	22,8
7	50	8,50'	8,35'	53	„	153,7	1' 15"	0°,563	21
	350						(Ausflußzeit des H_2O bei 37° C = 0' 50" 2/5)		

$K_{37°}$ des injizierten Wassers = $4{,}1 \times 10^{-4}$.

Δ „ „ „ = 0°,005.

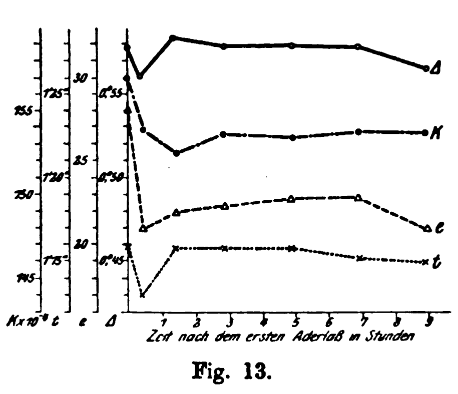


Fig. 13.

Bei diesem Experiment wurde pro Kilogramm des Tieres ein doppelt so großes Volumen derselben Flüssigkeit, die beim vorigen Experiment verwendet wurde, injiziert, und zwar mit größerer Geschwindigkeit. Die Schwankungen sind, auch sofort nach der Injektion, nicht sehr groß. Die Abnahme der molekularen Konzentration und der Ausflußzeit verschwindet rasch, während die der elektrischen Leitfähigkeit und die des Hämatokriten bis über die 8. Stunde hinaus andauern.

Auch in diesem Falle enthält das Serum viel Hämoglobin.

15. Experiment. — 6. Februar 1908. — (Temperatur der Umgebung 10° C.)

♀ Hund, 18,280 kg schwer, hungert seit 14 Stunden.

9h 30'	vormittags	Unter Anwendung des Katheters werden dem Tiere 10 ccm Harn entzogen.
9h 50'	„	Der linken A. femoralis werden 50 ccm Blut entnommen: 40 ccm lasse ich im geschlossenen Gefäß und bei der Temperatur der Umgebung spontan gerinnen, die anderen 10 ccm werden defibriniert.
10h 2'	„	In die rechte V. femoralis werden 914 ccm Trinkwasser injiziert.
11h 7'	„	Ende der Injektion.
11h 12'	„	Der linken A. femoralis werden weitere 50 cm Blut entnommen und auf die angegebene Weise aufbewahrt.
12h	„	Idem.
12h 10'	nachmittags	Entnahme einer weiteren Harnprobe (15 ccm); der Harn ist blutig.
1h 30'	„	Es werden 40 ccm Blut entnommen.
3h	„	Idem.
4h	„	Entnahme einer weiteren Harnprobe (20 ccm).
5h 0'	„	Es werden 50 ccm Blut entnommen.
6h 30'	„	Idem.
6. Februar.		
9h 30'	vormittags	Unter Anwendung des Katheters werden dem Tiere 150 ccm Harn entzogen.
10h 0'	„	Der rechten A. femoralis werden 50 ccm Blut entnommen und auf die angegebene Weise aufbewahrt.

Dauer der Injektion: 1h 5'. — Kubikzentimeter der pro kg des Tieres injizierten Flüssigkeit: 50,0. — Pro Kilogramm und Minute: 0,72 ccm.

Während des Experimentes gab das Tier viel Speichel von sich.

Am Morgen des 6. Februar bestimmte ich die elektrische Leitfähigkeit und die Ausflußzeit des von den verschiedenen

Tabelle XV (15. Experiment).

Injektion: Trinkwasser. — ccm pro Kilogramm Körpergewicht = 50,0.

	Blut			Blutserum				Defibriniert. Blut		Harn					
Aderlaß	Blut ccm	Zeit nach dem ersten Aderlaß in Stunden	Zeit nach dem Ende der Injektion in Stunden	ccm Serum % Blut	Bemerkungen	Elektrische Leitfähigkeit (K×10⁻⁴ 37° C)	Ausflußzeit 37° C. (t)	Erniedrigung des Gefrierpunktes (△)	Hämatokrit (e)	Harnprobe	Zeit nach dem Anfang der Injektion in Stunden	Elektrische Leitfähigkeit (37° C. K×10⁻⁴)	Ausflußzeit bei 37° C. (t)	Erniedrigung des Gefrierpunktes (△)	Bemerkungen
1	50	—	—	30	klar, leicht rosenrot	152,8	1′ 30″ 4/5	0°,557	44,5	1	—	241,3	1′ 8″ 1/5	1°,686	klar
2	50	1,22′	0,5′	40	klar rot	144,2	1′ 28″	0°,558	37(?)						
3	50	2,10′	0,53′	30	„ „	146,4	1′ 28″	0°,560	43						
4	50	3,40′	2,23′	30	„ „	147,4	1′ 27″ 3/5	0°,562	43	2	2,8′	79,6	1′ 43″ 1/5	0°,858	rot
5	50	5,10′	3,53′	28	„ „	147,9	1′ 28″	0°,562	43,5						
6	50	7,10′	5,53′	—	„ „	148,6	1′ 28″	0°,556	44	3	5,58′	84,1	1′ 16″ 2/5	1°,130	„
7	50	8,40′	7,23′	—	„ „	148,1	1′ 28″ 2/5	0°,547	44						
8	50	24,10′	22,53′	—	„ „	149,2	1′ 28″	0°,558	39	4	23,28′	162,1	1′ 7″ 2/5	2°,008	leicht rosenrot
	400						(Ausflußzeit des H_2O bei 37° C = 0′57″ 4/5)						(Ausflußzeit d. H_2O bei 37° C = 0′57″ 4/5)		

$K_{37°}$ des injizierten Wassers = $4,1 \times 10^{-4}$.

△ „ „ „ = 0,005.

Proben des spontan geronnenen Blutes gebildeten Serums, den Gefrierpunkt und das Blutkörperchenvolum des defibrinierten Blutes. Gleichzeitig bestimmte ich die elektrische Leitfähigkeit, die Ausflußzeit und die molekulare Konzentration der verschiedenen Proben des entnommenen Harns.

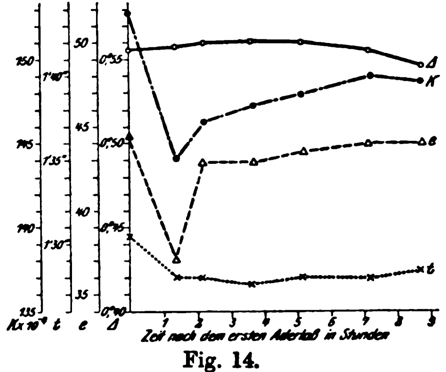


Fig. 14.

Die erhaltenen Werte sind in der XV. Tabelle zusammengestellt:

Das in die Venen des zu diesem Experimente dienenden Tieres injizierte Volumen Flüssigheit war doppelt so groß als das beim vorhergehenden Experiment injizierte; dagegen war die Injektion eine etwas langsamere. Die Resultate zeigen keine erheblichen Unterschiede.

Die molekulare Konzentration darf als unverändert betrachtet werden, die hämatokritischen Schwankungen verschwinden kurze Zeit nach der Injektion, die der elektrischen Leitfähigkeit und der Ausflußzeit halten länger an, wenn sie auch unbedeutend sind.

Der während des Experimentes aufgefangene Harn enthielt eine sehr große Menge Hämoglobin; seine elektrische Leitfähigkeit und seine molekulare Konzentration sind sehr vermindert, während die Ausflußzeit zugenommen hat. Wenn letztere aber nach den 24 Stunden fast den normalen Wert wieder erreicht hat, nehmen elektrische Leitfähigkeit und molekulare Konzentration zu, die Ausflußzeit aber nimmt ab, und zwar sinkt sie unter den für die Probe von normalem Harn erhaltenen Wert.

IV. Schlußfolgerungen.

Die Resultate meiner Experimente kann ich folgendermaßen zusammenfassen:

Der einfache Aderlaß verursacht Schwankungen der physikochemischen Eigenschaften des Blutes, die im Vergleich mit den bei den anderen Experimenten beobachteten vollständig unberücksichtigt bleiben können.

A. Injektionen von hypertonischen Lösungen.

Ungefähr 10%ige (im Verhältnis von 10 ccm pro Kilogramm des Tieres injizierte) NaCl-Lösungen verursachen eine starke Erhöhung der molekularen Konzentration des Blutes und der elektrischen Leitfähigkeit des Blutserums; diese Erhöhung scheint nicht einmal nach 24 Stunden nachzulassen.

Ähnliche Schwankungen der elektrischen Leitfähigkeit zeigen sich nach Injektion von ca. 7%igen Lösungen; ca. 3%ige und 5%ige (stets im Verhältnis von 10 ccm pro Kilogramm des Tieres injizierte) Lösungen bewirken stets eine Erhöhung der molekularen Konzentration und der elektrischen Leitfähigkeit; diese Erhöhung ist aber nicht so stark ausgeprägt wie in den vorhergehenden Fällen und nimmt schon in der 7. und 8. Stunde nach der Injektion ab. Eine vollständige Rückkehr zum normalen Zustande habe ich jedoch während der Dauer eines jeden Experimentes niemals beobachtet. Die mit dem Hämatokriten gefundenen und die vermittels der viscosimetrischen Methode konstatierten Schwankungen des Blutkörperchenvolums und die Viskosität des Blutserums sind bei den einzelnen mit verschieden konzentrierten Lösungen vorgenommenen Experimenten sehr ungleich. Die ersteren bestehen wesentlich in einer raschen Abnahme der Werte unmittelbar nach der Injektion und dann in einer Zunahme, bis sie in der 4. und 5. Stunde, wenn es sich um sehr konzentrierte Lösungen handelt, und auch früher bei mäßig konzentrierten Lösungen, fast den normalen Wert erreichen. Die letzteren bestehen auch in einer raschen Abnahme unmittelbar nach der Injektion und dann in einer Erhöhung, die jedoch in keinem Falle, selbst nicht nach der 7. Stunde, bis zum normalen Werte fortschreitet.

Daraus ist zu folgern, daß die Injektion einer hypertonischen NaCl-Lösung Schwankungen des osmotischen Druckes des Blutes und der elektrischen Leitfähigkeit des Serums hervorruft, die um so deutlicher hervortreten und um so länger anhalten, je größer die Konzentration der Lösung ist, und daß im allgemeinen Injektionen von hypertonischen NaCl-Lösungen die molekulare Konzentration des Blutes und die elektrische Leitfähigkeit des Serums eine verhältnismäßig lange Zeit hindurch auf einem hohen Niveau erhalten,

während sie nur zu einer vorübergehenden Verdünnung der Blutmasse Veranlassung geben.

Zu einigermaßen abweichenden Schlußfolgerungen scheinen andere Autoren gelangt zu sein, welche ebenfalls die Schwankungen der Konzentration des Blutes nach intravenösen Injektionen von hypertonischen Lösungen studiert haben. So fand Hamburger bei Experimenten am Pferde, dem er in verschiedenen Zeiträumen nach Injektion einer 3,33 %igen NaCl-Lösung oder einer 11,33 %igen (mit einer 2 %igen NaCl-Lösung äquimolekularen) $Na_2SO_4 + 10 H_2O$-Lösung, daß in kurzer Zeit (nach 2 bis 3 Stunden) der Salzgehalt des Blutes zum normalen Werte zurückkehrt und die anfängliche Erhöhung des osmotischen Druckes verschwindet. In ähnlicher Weise fanden Achard und Loeper und in jüngster Zeit Ouschinsky, als sie kryoskopische Bestimmungen am Blute von Kaninchen vornahmen, denen sie eine (ca. 10 %ige) hypertonische NaCl-Lösung injiziert hatten, daß nach Verlauf von wenigen Stunden die Erniedrigung des Gefrierpunktes einen dem normalen sehr nahen Wert erreicht hatte.

Der Unterschied zwischen den von mir erhaltenen Resultaten und denen Hamburgers stellt sich jedoch als geringer heraus, als es auf den ersten Blick scheint, wenn man die Konzentration (3 % NaCl) der von mir verwendeten Lösungen ins Auge faßt. Hamburger verwendete als stark hypertonische Lösungen diejenigen, welche von mir als mäßig hypertonisch betrachtet wurden. Ferner muß man bei Beurteilung der Experimente Hamburgers bedenken, daß das Natriumsulfat bekanntlich rascher als die anderen Salze aus dem Organismus ausgeschieden wird, weil seine harntreibende und purgierende Wirkung größer ist.

Was sodann die Unterschiede zwischen meinen Resultaten und denen der anderen oben zitierten Autoren betrifft, so ist es möglich, daß sie abhängen von der Verschiedenheit der Versuchstiere, von der verschiedenen Geschwindigkeit, mit der die Injektionen vorgenommen wurden, und vielleicht auch von dem Umstande, daß die von mir verwendeten Tiere stets während der ganzen Dauer des Experimentes unbeweglich auf dem Fixierungsapparat lagen, die von Hamburger, Achard und Loeper usw. verwendeten sich dagegen frei bewegen

durften. Außerdem darf man nicht vergessen, daß solche Unterschiede auch durch den verschiedenen Ernährungszustand veranlaßt werden können, in dem sich das Tier während der dem Experiment vorausgehenden Tage befindet.

Injektionen von hypertonischen Rohrzucker-Lösungen, die 8%igen NaCl-Lösungen äquimolekular sind, veranlassen eine geringe Zunahme der molekularen Konzentration des Blutes, die eine gewisse Zeit hindurch andauert, während die einer 5%igen NaCl-Lösung äquimolekularen eine geringe Zunahme bewirken, die rasch verschwindet. Ouschinsky fand nach einer hypertonischen Injektion von Traubenzucker das $\triangle$ des Blutes nicht erhöht und sah, daß diese Substanz rasch von der Leber fixiert wurde.

Dagegen nimmt die elektrische Leitfähigkeit des Blutserums stark ab bei beiden Konzentrationen; nach kurzer Zeit aber (ca. 3 Stunden nach der Injektion) nimmt sie so sehr zu, daß sie den normalen Wert übertrifft. Die hämokritischen und viscosimetrischen Schwankungen sind denen der elektrischen Leitfähigkeit ähnlich; es übersteigen jedoch schon von der 1. Stunde nach der Injektion an sowohl die Werte des Hämatokriten als die des Viscosimeters die beim normalen Blute erhaltenen.

Der Unterschied zwischen diesen Resultaten und den mit hypertonischen NaCl-Lösungen erhaltenen ist augenfällig, und wir können daraus schließen, daß die physiko-chemischen Schwankungen des Blutes in toto und des Blutserums nach hypertonischen Injektionen von Rohrzucker in sehr kurzer Zeit verschwinden, bei weitem schneller als die infolge von gleichfalls hypertonischen Injektionen von Chlornatrium eintretenden.

Dies erklärt sich wahrscheinlich aus dem Umstand, daß der Rohrzucker, da er eine dem Organismus fremde und durch ihn nicht assimilierbare Substanz ist, rasch ausgestoßen wird, weil er in den Geweben nichts findet, woran er zeitweilig haften kann, und auch nicht, wie der Traubenzucker in der Leber, umgewandelt und infolgedessen zurückgehalten werden kann.

B. Injektionen von isotonischen Lösungen.

Aus den Ergebnissen der mit einer 0,90%igen NaCl-Lösung gemachten Experimente läßt sich schließen, daß die

Injektion einer dem Blute annähernd isotonischen Lösung von Chlornatrium äußerst unbedeutende Schwankungen der physiko-chemischen Eigenschaften des Blutes verursacht, sei es nun unmittelbar nach der Injektion oder auch lange Zeit nachher.

Dies stimmt mit dem überein, was Dastre und Loye fanden, als sie mit nicht übermäßiger Geschwindigkeit eine gewisse Menge einer dem Blute ungefähr isotonischen Lösung injizierten; sie sahen, daß unter solchen Bedingungen kein wahrer und andauernder Zustand von hydrämischer Plethora eintritt.

C. Injektionen von hypotonischen Lösungen.

Injektionen von stark hypotonischen Lösungen verursachen sehr wenig ausgeprägte physiko-chemische Schwankungen des Blutes, wenn das Volumen der injizierten Flüssigkeit und die Geschwindigkeit der Injektion nicht sehr groß sind. Unter derartigen experimentellen Bedingungen nimmt die molekulare Konzentration des Blutes nicht ab, sondern erfährt eine wenn auch unbedeutende Zunahme; die hämokritischen Werte zeigen zuerst eine Erhöhung und dann eine langsame Rückkehr zur normalen Größe; die elektrische Leitfähigkeit und die Ausflußzeit dagegen nehmen unmerklich immer mehr ab. Ist aber die Menge der injizierten Flüssigkeit ziemlich beträchtlich oder die Geschwindigkeit der Injektion bedeutend, so daß eine Veränderung der Elemente der Blutkörperchen erfolgt, so treten die physiko-chemischen Schwankungen etwas deutlicher hervor; die hämatokritischen Schwankungen nehmen dann den entgegengesetzten Sinn zu den weiter oben besprochenen an.

In ähnlicher Weise fanden Achard und Loeper sowie auch Hamburger nach Injektionen von sehr hypotonischen Salzlösungen unbedeutende Schwankungen in der Zusammensetzung des Blutes.

Dies beweist, daß das Wasser mit außerordentlicher Geschwindigkeit aus dem Blutplasma verschwindet, indem es durch Osmose und Imbibition in die Zellelemente des Blutes und der Gewebe eindringt.

Hydrolyse von Wittepepton.

Von

P. A. Levene und D. D. van Slyke.

(Aus dem Rokefeller Institute for Medical Research, New York).

(Eingegangen am 20. August 1908.)

Die Hydrolyse von Wittepepton wurde als Vorversuch zur Plasteinhydrolyse, über die in der folgenden Arbeit berichtet wird, vorgenommen. Es stand uns eine beschränkte Menge Plastein (130 g), die aus Wittepepton gewonnen war, zur Verfügung, und es war aus zwei Gründen wünschenswert, zunächst die Muttersubstanz zu hydrolysieren: erstens, um festzustellen, ob alle die Komponenten des Fibrins, jenes Proteins, aus welchem das Pepton hergestellt war, im Pepton vorhanden waren, und zweitens, um an einem leicht erhältlichen Material die Methoden zu prüfen, die auf das Plastein angewendet werden sollten.

Weil die Methode einer kleinen Menge Material angepaßt werden mußte, war es erforderlich, die Bestimmungen sämtlicher Spaltungsprodukte gleichzeitig zu machen, anstatt, wie gewöhnlich, getrennt Tyrosin, die veresterbaren Monoaminosäuren und die Diaminosäuren zu bestimmen. Für solche Fälle empfiehlt E. Fischer[1]), mit Schwefelsäure zu hydrolysieren und die Schwefelsäure mit Baryt zu entfernen; man erhält Tyrosin durch Auskrystallisieren, fällt sodann die Hexonbasen als Phosphorwolframate und verestert die zurückbleibenden Aminosäuren.

Die nach einigen Versuchen von uns gewählte Methode unterschied sich nun in verschiedenen Einzelheiten von dem üblichen Verfahren.

---

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 39, 530, 1906.

Die Salzsäure ist aus verschiedenen Gründen ein besseres hydrolysierendes Mittel als die Schwefelsäure und ihr vorzuziehen. Wenn man Salzsäure anwendet, erhält man den größeren Teil der Glutaminsäure nach der Hydrolyse direkt als Hydrochlorid, indem man einfach die Lösung konzentriert und mit Salzsäuregas sättigt. Die Entfernung großer Mengen Schwefelsäure bedingt das Auswaschen sehr großer Massen Bariumsulfats und bringt wegen der Schwierigkeit des gründlichen Waschens die Gefahr von Verlusten mit sich. Die Entfernung der Salzsäure durch Einengen und Ausfällen mit Bleioxyd und Silbersulfat ist verhältnismäßig sauber. Die Einzelheiten werden bei der zweiten Hydrolyse beschrieben. Ein wichtiger Umstand zugunsten der Salzsäure als hydrolisierendes Agens liegt ferner in der Tatsache, daß man Tyrosin bei Anwendung von Salzsäure sofort praktisch rein erhalten kann, während das Tyrosin bei einer Schwefelsäurehydrolyse gewöhnlich eine Umkrystallisation erfordert, bevor es auch nur annähernd rein ist. Durch weitere Konzentration und Umkrystallisieren kann man auch im ersten Falle die Leucin-Valinfraktion fast weiß erhalten, nach der Analyse und der Eigenschaft anscheinend ebenso rein wie aus der entsprechenden Esterfraktion. Die so gewonnene Menge Leucin und Valin zusammen mit einer kleineren Menge bei der folgenden Veresterung der nicht krystallisierten Säuren war bedeutend größer als die Quantität, welche man durch die gewöhnliche Veresterung der gesamten Lösung erhält; denn der durch Krystallisation abgeschiedene Teil erleidet den bei der Veresterung entstehenden Verlust nicht. Bei Anwendung von Schwefelsäure als hydrolysierendes Mittel werden die nach der Tyrosinabscheidung ausfallenden Aminosäuren dunkel und hoffnungslos unrein.

Die nicht auskrystallisierten oder durch Phosphorwolframsäure nicht ausgefällten Aminosäuren wurden nach der gewöhnlichen Methode verestert. Wenn man indessen die Ester für die Ätherextraktion in Freiheit setzen will, wurden statt des gewöhnlich benutzten Natriumhydrats und festen kohlensauren Kaliums Bariumhydrat und -oxyd genommen, die schon früher in diesem[1]) Laboratorium gebraucht worden sind. Die Bariummethode bietet verschiedene bedeutende Vorteile:

[1]) Journ. of Biolog. Chem. 2, 128, 1906.

Erstens erleichtert sie die Entfernung der Mineralstoffe aus dem ausgezogenen Rückstande, wenn man den letzteren nochmals verestern will oder auf unveresterte Produkte zu prüfen beabsichtigt.

Zweitens fehlt die große Erhitzung, die bei Anwendung von Natriumhydroxyd und Pottasche sich als so sehr lästig erweist.

Drittens macht sie das Vorhandensein von mehr als einem kleinen Überschuß an Alkali in der Flüssigkeit wegen der geringen Löslichkeit des Bariumhydrats in der Kälte unmöglich. Die beiden zuletzt genannten Momente müssen darauf hinwirken, den Eintritt einer Verseifung der Ester während der Freimachung und des Extraktionsprozesses zu verringern.

Wegen dieser Vorteile der Bariummethode geben wir die Einzelheiten des Prozesses an, wie wir ihn am geeignetsten für die Ausführung fanden:

Wie Fischer empfiehlt, wird die Lösung der Ester im Vakuum bei einer Badtemperatur nicht über 50° konzentriert. Die eingeengte Lösung wird in ein Porzellan- oder besser in ein emailliertes Gefäß gegossen (von ungefähr 1 Liter Inhalt für jede 125 bis 150 g hydrolysiertes Protein). Die letzten Mengen der Esterlösung werden in das Gefäß mit eiskaltem Barytwasser gespült, da das Volumen des letzteren geringer als das der Esterlösung sein soll. Die Masse in dem Gefäß wird sofort mit $1^1/_2$ oder mehr Volumen eiskalten Äthers bedeckt, und ein Überschuß von krystallisiertem Bariumhydrat hineingegeben; das Gefäß wird sogleich in eine Kältemischung gestellt und sein Inhalt schnell mit einem hölzernen Spatel oder Porzellanlöffel gerührt. Die anfangs recht klebrige Masse wird in wenigen Minuten flüssig und nimmt alkalische Reaktion an. Wenn die Lösung alkalisch gegen Lackmus geworden ist, wird der Äther erneuert und das Rühren fortgesetzt sowie pulverisiertes und frisch geschmolzenes wasserfreies Bariumoxyd allmählich zugegeben. Da das Baryumoxyd der Lösung das freie Wasser entzieht, gehen die Reste der Ester in den Äther über. Der Äther wird mehrere Male ersetzt und Baryumoxyd so lange hinzugefügt, bis das freie Wasser aus der Mischung vollständig entfernt ist. Während dieses Vorgangs wird die Mischung zuerst trübe und klebrig, dann geht sie in eine leicht bewegliche Masse von trockenem Bariumhydrat und Äther über.

Falls man das Barium aus dem Rückstande entfernen will, wird letzterer mit kaltem Wasser angerührt und über Asbest filtriert. Die organische Substanz wird aus dem Rückstande durch wiederholtes Verreiben ausgespült. Die Hauptmenge von Barium löst sich nicht auf, das in Lösung gegangene wird durch die äquivalente Menge Schwefelsäure entfernt. Die Lösung, welche mit Salzsäure stark angesäuert wird, ist dann fertig, um nochmals verestert oder anderweitig behandelt zu werden. Bei Entfernung des Bariums nach der Veresterung von 390 g Wittepepton erhielten wir einen organischen Rückstand, aus dem man mehrere Gramm reinen Serins durch Krystallisation leicht abtrennen konnte. Ein früherer Versuch von Brunner, Serin aus einem Kilo Fibrin mittels der gewöhnlichen Estermethode zu gewinnen, war gescheitert.[1])

Die Behandlung der Leucinfraktion der Ester wurde durch die Entdeckung erleichtert, daß Leucinester ebenso wie der Ester des Phenylalanins leicht durch Äther aus der Lösung oder Suspension in Wasser ausgezogen werden kann. Wenn die Esterfraktion, die gewöhnlich Leucin, Valin und Alanin enthält, mit drei Volumen Wasser vermischt, die Lösung mit Äther extrahiert und der Auszug dann dreimal hintereinander mit Wasser gewaschen wird, so geht praktisch alles Leucin in die ätherische Lösung über und diese enthält gewöhnlich nur wenig Valin. In einem Falle erhielt man analysenreines Leucin ohne weitere Reinigung durch Verseifung des Ätherextraktes. Die Wasserlösung enthält den unausgezogenen Ester von Valin und Alanin. Reines Valin erhält man durch fraktionierte Krystallisation, Alanin durch Umkrystallisieren des löslicheren Anteils aus verdünntem Alkohol.

Wir fanden später, daß der Fällung des Leucins aus der Mischung von Leucin und Valin vermittels Bleiacetat und Ammoniak — einer früher von Levene und Beatty angewandten Methode[2]) — die Möglichkeit der quantitativen Trennung dieses unerfreulichen Gemisches bietet. Ein Überschuß eines der Reagenzien ist von Nachteil, und die Bedingungen für eine scharfe Trennung müssen genau ermittelt werden. Diese Be-

---

[1]) Dissertation, Berlin, 1905.

[2]) Diese Zeitschr. 4, 307, 1907.

dingungen sollen in einer späteren Arbeit noch präziser festgestellt werden.

Erste Hydrolyse.

Bei der ersten Hydrolyse wurden nur die veresterbaren Säuren bestimmt.

360 g Wittepepton wurden durch zehnstündiges Kochen mit 1,5 l 25%iger Salzsäure hydrolysiert. Die Lösung wurde ungefähr auf 850 ccm eingedampft und mit Salzsäuregas gesättigt. Nachdem sie mehrere Tage bei —2° gestanden hatte, wurde die Flüssigkeit über Asbest filtriert. Das abgeschiedene rohe Glutamisäurehydrochlorid wurde wieder in heißem Wasser gelöst, durch Kochen mit viel Baryt von Ammoniak befreit. Der Baryt wurde entfernt, die Lösung im Vakuum konzentriert und mit gasförmiger Salzsäure gesättigt; 36,0 g Glutaminsäurehydrochlorid wurden dabei genommen. Ein Teil der Glutaminsäure wurde mit Ammoniak freigemacht und aus Wasser umkrystallisiert.

Analyse:

0,1253 g Substanz; 0,1866 g CO_2 u. 0,0718 g H_2O.

	C	H
Gefunden:	40,61%	6,41%
Berechnet $C_5H_9O_4N$:	40,80%	6,12%

Die krystallisierbaren Säuren wurden bei dieser Hydrolyse nicht abgetrennt, vielmehr wurde die Lösung sofort eingeengt und verestert und die Veresterung zweimal wiederholt. Die Ester wurden mit Barium freigemacht, ausgezogen und im Vakuum destilliert. Der Rückstand wurde von Barium befreit, dann wieder verestert, und diese zweimalige Wiederholung des Vorganges ergab die Ester B, C und D. Während der Destillation bei weniger als 1 mm Druck mit der Geryk-Pumpe wurden die sich entwickelnden Dämpfe durch Schwefelsäure absorbiert, statt durch flüssige Luft kondensiert zu werden. Diese Methode haben wir schon früher beschrieben.[1]) Es sei hervorgehoben, daß während der vorangehenden Destillation der niedriger siedenden Fraktionen mittels der Wasserstrahlpumpe die entweichenden Dämpfe nicht durch Schwefelsäure gesogen werden; vielmehr wird die Pumpe, die mit einem kleinen Manometer

---

[1]) Diese Zeitschr. 10, 214, 1908.

verbunden ist, an jenem Rohr befestigt, das an dem Fischer-Harriesschen Apparat dazu besimmt ist, das Vakuum abzulassen. Diese Funktion wird durch einen Hahn mit einem T-Rohr vollzogen, das einen Teil der Verbindung mit der Pumpe bildet.

Folgende Fraktionen an Destillationsprodukten entstehen bei den verschiedenen Veresterungen:

Frak.		Temp. d. Dampf.	Druck in mm	Ausbeuten A	B	C	D	Sum.
I.	von	70—75°	12,0	26,65	15,30	12,70	7,10	61,8
II.	bis	100°	0,5	43,30	25,00	14,10	5,20	87,6
III.	bis	140°	0,5	57,90	32,90	12,60	3,00	106,4
								255,8

Fraktion I (von 70° bis 75° bei 12 mm).

Die Ester, die durch Kochen am Rückflußkühler mit dem 7 oder 8 fachen Volumen Wasser verseift waren, ergaben 16,4 g Aminosäuren. Nach dem Ausziehen des Prolins durch absoluten Alkohol ging ihre Menge auf 7,1 g zurück. Sie wurden in wenig Wasser gelöst und mit einer alkoholischen Lösung von 8 g Pikrinsäure versetzt. Man erhielt 5,65 g pikrinsaures Glykokoll, die 1,40 g Glykokoll entsprechen, vom Schmelzpunkte 190°.

Analyse:

0,1277 g Substanz ergaben 19,9 ccm Stickstoff bei 20° und 766 mm (über 23 %igen KOH).

	N
Gefunden:	17,97 %
Berechnet $C_8H_8N_4O_9$:	18,43 %

Das Filtrat wurde vermittels Schwefelsäure und Äther von der Pikrinsäure befreit und mit dem Alanin der Fraktion II auf diese Aminosäure verarbeitet.

Fraktion II (bis 100° bei 0,4—0,6 mm).

Die Tatsache, daß Leucinester durch Extraktion mit Äther von den andern Estern getrennt werden konnte, war noch nicht bekannt, als diese Fraktion verarbeitet wurde; infolgedessen wurde sie sofort durch Kochen mit Wasser verseift. Man erhielt so 58,6 g Aminosäuren. Nachdem das Prolin mit kochendem Alkohol ausgezogen war, blieben 47,5 g zurück. Diese wurden

einer fraktionierten Umkrystallisation unterworfen und ergaben Leucin, Valin und Alanin in analytisch reinem Zustande. Man erhielt 21,7 g reines Leucin, 1,0 g reines Valin und 15,2 g einer Mischung von Leucin und Valin, die durch die Krystallisation nicht trennbar war.

Leucin-Analyse:

0,1169 g Substanz ergaben 0,2341 g CO_2 und 0,1021 g H_2O.

	C	H
Gefunden:	54,74 %	9,77 %
Berechnet $C_6H_{13}NO_2$:	54,92 %	9,99 %

Valin-Analyse:

0,1453 g Substanz ergaben 0,2732 g CO_2 und 0,1239 g H_2O.

	C	H
Gefunden:	51,28 %	9,53 %
Berechnet $C_5H_{11}O_2N$:	51,24 %	9,47 %

Aus der Mutterlauge des Leucins und Valins plus der des Glykokolls aus Fraktion I wurden 10,2 g Alanin gewonnen.

Alanin-Analyse:

0,1590 g Substanz ergaben 0,2360 g CO_2 und 0,1093 g H_2O.

	C	H
Gefunden:	40,48 %	7,69 %
Berechnet $C_3H_7O_2N$:	40,42 %	7,93 %

Prolin.

Die alkoholischen Extrakte der Aminosäuren aus Fraktion I und II wurden vereinigt eingeengt und wieder mit absolutem Alkohol aufgenommen. Der ungelöste Teil wurde durch Filtration abgetrennt und das Filtrat bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand war in kaltem Alkohol völlig löslich. Die in Alkohol lösliche Säure, als Prolin berechnet, macht 16,4 g aus. Zur Identifizierung wurde es mit Bariumhydrat racemisiert und ins Kupfersalz verwandelt. Das letztere war nach einer Umkrystallisation aus wenig Wasser rein. Es zeigte die charakteristische Veränderung von blau zu violett beim Erhitzen, und das wasserfreie Salz hatte folgende Zusammensetzungen:

0,1544 g Substanz ergaben 0,0329 g Kupfer durch Elektrolyse.

		Cu
Gefunden:		21,31 %
Berechnet	$Cu(C_5H_8O_2N)_2$:	21,80 %

Fraktion III (bis 140° bei 0,4—0,6 mm).

Die Ester dieser Fraktion wurden bei jeder Veresterung in drei Volumen Wasser gegossen und der Phenylalaninester nach der Angabe von Fischer mit Äther ausgezogen. Der Phenylalaninester wurde dann mit konzentrierter Salzsäure verseift und die Lösung stark konzentriert. Die Ausbeuten an Phenyalaninhydrochlorid der einzelnen Fraktionen wurden zusammen aus konzentrierter Salzsäure umkrystallisiert. Die Aminosäure wurde mit Ammoniak freigemacht und aus Wasser umkrystallisiert; erhalten wurden 9,36 g.

Analyse:

0,1291 g Substanz ergaben 0,2975 g CO_2 und 0,0786 g H_2O.

		C	H
Gefunden:		65,07 %	7,05 %
Berechnet	$C_9H_{11}O_2N$:	65,41 %	6,72 %

Aus dem Filtrat vom umkrystalliserten Phenylalaninhydrochlorid wurde 4,2 g rohes Leucin (C = 53,07 %, H = 9,58) gegewonnen.

Die nicht durch Äther ausziehbaren Ester wurden mittels Bariumhydratlösung verseift. Da asparaginsaures Barium nicht leicht krystallisiert, wurden die vereinigten Lösungen durch Schwefelsäure vom Barium befreit, konzentriert und mit gasförmiger Salzsäure gesättigt. Man erhielt 1,0 g salzsaure Glutaminsäure, wodurch die Gesamtausbeute daran auf 37,0 g stieg, was 29,67 g freier Glutaminsäure entspricht.

Das Filtrat wurde durch Konzentration im Vakuum von Salzsäure befreit und mit Bleioxyd und Silbersulfat behandelt. Durch direkte Krystallisation wurden so 6,10 g Asparaginsäure gewonnen.

Analyse:

0,1526 g Substanz ergaben 0,2032 g CO_2 und 0,0757 g H_2O.

		C	H
Gefunden:		36,14 %	5,55 %
Berechnet	$C_4H_7O_4N$:	36,06 %	5,30 %

Übrig blieb ein beträchtlicher Rückstand, aber man konnte daraus weder durch Krystallisation noch durch Behandlung mit Kupferacetat eine definierte Substanz erhalten.

Zweite Hydrolyse.

Die in der Einleitung angegebene Methode wurde bei dieser Hydrolyse befolgt.

Tyrosin und Hexonbasen, die bei der ersten Hydrolyse nicht ermittelt waren, wurden hier bestimmt. Serin, das nicht aus dem Ester isoliert werden konnte, wurde in diesem Falle leicht aus dem bariumfreien Rückstande der mit Äther ausgezogenen Ester gewonnen. Man gewann auch Glykokoll aus diesem Rückstande, wodurch sich die Ausbeute daran noch vergrößerte. Der größere Teil des Leucins und des Valins wurde durch Krystallisation abgeschieden, bevor die Säuren verestert wurden, und die Ausbeute stieg infolgedessen. Die Methode zur Bestimmung der übrigen Produkte war nicht verschieden von der in der ersten Hydrolyse angewandten, so daß wir nur die Isolierung derselben beschreiben werden.

392 g Wittepepton wurden hydrolysiert und das Glutaminsäurehydrochlorid abgeschieden. Das Filtrat samt der Mutterlauge vom umkrystallisierten Glutaminsäurehydrochlorid wurde im Vakuum eingedampft, um den größeren Teil der Salzsäure zu entfernen. Die Lösung wurde dann bis auf 7 Liter verdünnt und mit Bleioxyd bis zur alkalischen Reaktion erwärmt. (Das Bleioxyd war mit Baryt gefällt, durch Dekantieren gewaschen und in Form einer Paste aufbewahrt.) Über Nacht ließ man die Lösung abkühlen und filtrierte sie dann. Die harzigen Beimengungen waren augenscheinlich durch den Niederschlag absorbiert, denn die Lösung ging klar und nur leicht gefärbt durchs Filter. Das noch zurückgebliebene Chlor wurde durch Titration von 5 ccm nach Volhard bestimmt und durch Erwärmen mit der erforderlichen Menge (146,5 g) Silbersulfat entfernt. Der größere Teil des aufgelösten Bleies wurde durch Zugabe von Schwefelsäure entfernt, solange noch ein Niederschlag entstand. Die geringen, noch restierenden Mengen des Metalls wurden durch Schwefelwasserstoff und der Überschuß von Schwefelsäure durch Baryt gefällt. Das Volumen

der Lösung wurde auf 7 Litern gehalten, um einen Verlust an Tyrosin möglichst zu vermeiden.

Tyrosin.

Die Lösung wurde auf ungefähr 1200 ccm konzentriert und über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Unter dem Mikroskop sah man, daß die abgeschiedene Substanz fast allein aus Tyrosinnadeln und aus wenigen Leucinkügelchen bestand.

Das Tyrosin wurde mit Wasser ausgewaschen, dann mit Alkohol und Äther behandelt und im Vakuum getrocknet. Es wog 12,72 g und war praktisch rein, wie die Stickstoffanalyse zeigte.

Analyse:

0,1608 g Substanz ergaben 10,8 ccm N bei 19° und 755 mm über 23%iger KOH).

		N
Gefunden:		7,66%
Berechnet	$C_9H_{11}O_3N$:	7,73%

Die Menge, welche zur Kohlenwasserstoff-Verbrennung gebraucht wurde, war noch umkrystallisiert.

Analyse:

0,1620 g Substanz ergaben 0,3568 g CO_2 und 0,0906 g H_2O.

		C	H
Gefunden:		60,06%	6,28%
Berechnet	$C_9H_{11}O_3N$:	59,67%	6,08%

Krystallisierbares Leucin und Valin.

Das Filtrat von dem Tyrosin wurde auf dem Dampfbade konzentriert, bis die Krystallisation gut einsetzte, und dann über Nacht im Kühlraume belassen. Die Krystalle erschienen unter dem Mikroskop ganz frei von Tyrosinnadeln.

Die Substanz wurde mehrere Male mit kleinen Portionen kalten Wassers, dann mit Alkohol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Produkt wog 19,20 g und war fast weiß, der Stickstoffinhalt erwies das Vorliegen von fast reinem Leucin.

Analyse:

0,0960 g Substanz ergaben 9,0 ccm N bei 750 mm und 16° (über 23%iger KOH).

		N
Gefunden:		10,84 %
Berechnet	$C_6H_{13}O_2N$:	10,69 %

Die Kohlen-Wasserstoff-Analyse zeigte indessen, daß die Substanz nicht rein war, sondern zweifellos die gewöhnliche Mischung von Leucin mit Valin darstellt, und zwar war letzteres in verhältnismäßig geringer Menge vorhanden.

Analyse:

0,1122 g Substanz ergaben 0,2218 g CO_2 und 0,0986 g H_2O.

		C	H
Gefunden:		53,91 %	9,83 %
Berechnet	$C_6H_{13}O_2N$:	54,92 %	9,99 %

Durch weitere Konzentration, die schließlich bis auf ungefähr 500 ccm fortgesetzt wurde, erhielt man zwei neue Fraktionen rohen Leucins, die 21,6 g ausmachten. Dieselben ergaben 10,88 und 10,72 % Stickstoff.

Das Filtrat wurde bis auf 7 Liter verdünnt und mit Schwefelsäure angesäuert, dann die Hexonbasen daraus durch Phosphorwolframsäure ausgefällt. Der Niederschlag wurde mit Phosphorwolframsäurelösung gewaschen, dann in einer hydraulischen Presse unter 300 kg Druck ausgepreßt.

Das Filtrat der Phosphorwolframate wurde vom Fällungsmittel befreit und im Vakuum eingeengt. Dabei schied sich eine neue Fraktion von Aminosäuren ab. Diese wurde umkrystallisiert und lieferte 6,5 g rohen Leucins (Kohlenstoff = 52,8 %). Dieses ergibt an krystallisiertem Leucin und Valin eine Gesamtausbeute von 47,9 g.

Um die Zusammensetzung des Gemisches noch schärfer festzustellen, wurden 40 g davon verestert, die Ester mit Baryt freigemacht und destilliert.

Fraktion	Temperatur des Bades	Temperatur der Dämpfe	Druck	Gewicht der Ester	Gewicht der Aminosäuren
I.	bis 90°	43—70°	12 mm	3,4	0,4
II.	bis 150°	60—90°	2 bis 2,5 mm	29,9	23,8
					24,2

Während der Destillation stieg die Temperatur bis auf 43°, nachdem der Äther und Alkohol übergetrieben waren, und blieb auf dieser Höhe, während eine kleine Menge Flüssigkeit überdestillierte, und stieg dann schnell bis auf 70°. Dann wurde die Gerykpumpe eingeschaltet und fast die gesamten Ester bei 60 bis 65° überdestilliert. Fraktion II, welche nahezu alle Aminosäuren enthielt, wurde in drei Volumen Wasser gegossen und die Lösung mit einer gleichen Äthermenge extrahiert. Die ätherische Lösung wurde dann dreimal mit Wasser gewaschen. Als der Rückstand des ätherischen Auszuges verseift wurde, ergab er beim erstmaligen Umkrystallisieren reines Leucin.

Analyse.

0,1507 g Substanz ergaben 0,3029 g CO_2 und 0,1366 g H_2O.

	C	H
Gefunden:	54,81 %	10,14 %
Berechnet $C_6H_{13}O_2N$:	54,92 %	9,99 %

Der ätherische Extrakt ergab 16,0 g Leucin, die unextrahierten Ester ergaben 7,7 g rohen Valins (Kohlenstoff = 49,79 %, Wasserstoff = 8,94 %). Die Umkrystallisation führte zu einer Substanz von der Zusammensetzung des reinen Valins.

Analyse.

0,1447 g Substanz ergaben 0,2720 g CO_2 und 0,1198 g H_2O.

	C	H
Gefunden:	51,14 %	9,26 %
Berechnet $C_5H_{11}O_2N$:	51,24 %	9,47 %

Anscheinend waren Leucin und Valin in den krystallisierten Aminosäuren ungefähr in dem Verhältnis von 2:1 vorhanden.

Der Rückstand aus der Veresterung wurde abermals verestert und ergab noch 3,8 g Aminosäuren, wodurch eine Gesamtausbeute von 70 % der ursprünglichen 40 g erreicht wurde. Wenn man den verhältnismäßig großen Verlust in Betracht zieht, der bei der Behandlung und Destillation einer so kleinen Menge in einem Apparate entsteht, der für die größeren, gewöhnlich bei der Proteinhydrolyse gewonnenen Quantitäten bestimmt ist, so ist das Ergebnis befriedigend und zeigt, daß die Bariummethode, die Ester in Freiheit zu setzen, keine Verluste oder unvollständige Extraktion zur Folge hat.

Veresterung der nicht krystallisierbaren Aminosäuren.

Das Filtrat von den Hexonbasen und den auskrystallisierten Säuren wurde verestert. Der Rückstand wurde von Barium befreit und nochmals verestert.

Fraktion	Temperatur des Bades	Temperatur der Dämpfe	Druck	Ausbeute A	Ausbeute B	Insgesamt
I.	bis 100°	bis zu 65°	12 mm	13,0	7,9	20,9
II.	„ 120°	„ „ 95°	0,3 „	22,8	8,4	31,2
III.	„ 180°	„ „ 145°	0,3 „	34,0	6,4	40,4
						92,5

Glykokoll aus den Estern.

Fraktion I wurde nochmals verestert, die Esterlösung im Vakuum eingedampft und mit Salzsäuregas gesättigt. Beim Stehen schieden sich aus der Lösung 0,9 g Glykokoll-Ester-Chlorhydrat ab, was 0,59 g Glykokoll gleich kommt. Viel mehr gewann man aus dem Esterrückstande, wie später beschrieben wird.

Analyse des umkrystallisierten salzsauren Glykokollesters:

0,1425 g Substanz verbrauchten 10,10 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$.

		Cl
Gefunden:		25,13%
Berechnet	$C_4H_{10}O_2NCl$:	25,40%

Leucin und Valin.

Fraktion II ergab 23 g Aminosäuren. Sie wurden mit absolutem Alkohol extrahiert, um Prolin zu entfernen, und einer fraktionierten Krystallisation unterworfen. Das Leucin war durch die vorhergegangene Krystallisation praktisch entfernt worden, denn die schwerlöslichste Fraktion (7,5 g) ergab bei der Analyse Daten, die denen des Valins verhältnismäßig nahestanden.

Analysen:

(1) 0,1395 g Substanz ergaben 0,2661 g CO_2 und 0,1177 g H_2O.
(2) 0,1423 g Substanz ergaben 0,2717 g CO_2 und 0,1200 g H_2O.

	C	H
Gefunden:	52,02%	9,44%
„	52,05%	9,43%
Berechnet $C_5H_{11}O_2N$:	51,24%	9,47%

Die Substanz wurde durch Kochen mit Kupferoxyd ins Kupfersalz umgewandelt, und das Kupfersalz mit Methylalkohol extrahiert, um das Valin aufzulösen. Die Lösung wurde im Vakuum bis zur Trockene eingedampft, und das Kupfer in dem wasserfreien Salz elektrolytisch bestimmt.

0,2105 g Substanz ergaben 0,0444 g Cu.

	Cu
Gefunden:	21,20%
Berechnet: $Cu(C_5H_{10}O_2N)_2$	21,50%

Das Kupfersalz wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt, die Aminosäure mit Baryt neutralisiert und in die α-Naphthylisocyanatverbindung nach Neuberg und Manasse[1]) verwandelt. Aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert, schmolz die Substanz bei 180 bis 181° in Übereinstimmung mit den Angaben von Osborne[2]) für die Racemform des Valins.

Analyse:

0,1524 g Substanz ergaben 0,3733 g CO_2 und 0,0857 g H_2O.

	C	H
Gefunden:	66,80%	6,38%
Berechnet $C_{16}H_{18}O_3N_2$:	67,10%	6,33%

Aus dem Filtrat der Fraktion, die das Valin, wie oben beschrieben, ergeben hatte, wurden noch 2 g an Valin gewonnen.

Analyse:

0,1544 g Substanz verbrauchten 12,96 ccm N/10 Schwefelsäure (nach Kjeldahl).

	N
Gefunden:	11,76%
Berechnet $C_5H_{11}O_2N$:	11,96%

Hierdurch steigt die Gesamtausbeute an Leucin und Valin auf 57,4 g oder 14,7%, während die erste Hydrolyse durch Veresterung allein nur 11,7% ergab.

Serin.

Der Rückstand, welcher nach der Entfernung der krystallisierbaren und veresterten Aminosäuren sowie der Hexon-

[1]) Neuberg u. Manasse, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 38, 2359, 1905.
[2]) Osborne, Amer. Journ. of Physiol. 17, 238, 1906.

basen zurückblieb, wurde von Barium befreit und zu einem Sirup auf dem Dampfbade eingeengt. Der Sirup wurde in einer kleinen Menge heißen Wassers aufgenommen und durch allmähliche Zugabe von mehreren Volumen absolutem Alkohols gefällt. Der Niederschlag war ein Gemisch von Serin und Glyhokoll.

Die Mischung wurde in heißem Wasser gelöst und Alkohol zugegeben, bis die Krystallisation begann. Die Lösung wurde über Nacht in den Eisschrank gestellt und so 3,1 g reines Serin gewonnen. Der Schnelligkeit nach zu schließen, mit der die Krystallisation vor sich ging, lag augenscheinlich die inaktive Form vor.

Analyse:

0,1407 g Substanz ergaben 0,1768 g CO_2 u. 0,0830 g H_2O.

0,1439 g Substanz ergaben 17,0 ccm Stickstoff bei 18° und 741 mm (über 23°/₀iger KOH).

	C	H	N
Gefunden:	34,28°/₀	6,60°/₀	13,54°/₀
Berechnet $C_3H_7O_3N$:	34,26°/₀	6,72°/₀	13,33°/₀

Nachdem das Glykokoll als Pikrat entfernt war, wurde die Mutterlauge eingedampft und mit Alkohol bis zur Trübung versetzt. Nach einigen Tagen des Stehens im Eisschrank krystallisierten noch 0,7 g unreines Serin langsam aus. (C = 37,0°/₀, H = 6,58°/₀).

Der nicht krystallisierte Rückstand wurde in der Annahme, daß er Oxyprolin enthalten könnte, ins Kupfersalz verwandelt. Um andere Kupfersalze niederzuschlagen, wurde die Lösung mit 4 Volumen absoluten Alkohols behandelt. Der geringe Niederschlag wurde abfiltriert und die Lösung zur Trockne eingedampft, Der Rückstand wurde mit absolutem Alkohol extrahiert, aber dabei ging nur sehr wenig Substanz in Lösung. Der Rückstand wurde bei 110° getrocknet und wog 1,37 g.

Die Analyse gab die Zusammensetzung von Serinkupfer.

0,2263 g Substanz lieferten 0,0526 g Kupfer (elektrolytisch)

	Cu
Gefunden:	23,25°/₀
Berechnet $Cu(C_3H_6O_3N)_2$:	23,40°/₀

Levene und Beatty erhielten auf die gleiche Methode aus Eiereiweiß eine Substanz von der ungefähren Zusammensetzung des Serins.

Es schien möglich, daß dies die aktive Form war, deren Vorkommen in Proteinen bis jetzt nur auf indirektem Wege von Fischer und seinen Schülern dargetan wurde. 1,055 g Kupfersalz, entsprechend 0,817 g Serin, wurden mit Schwefelwasserstoff zerlegt, der Überschuß von Schwefelwasserstoff ausgetrieben und die Spur entstander Schwefelsäure durch eine kleine Menge Bariumhydrat und dessen Überschuß durch Behandlung mit Kohlensäure und Aufkochen entfernt. Die Operation wurde mit quantitativen Vorsichtsmaßregeln ausgeführt. Die Lösung wurde auf weniger als 10 ccm eingedampft, dann auf dieses Volumen für die Untersuchung auf Drehungsvermögen gebracht. Spezifisches Gewicht 1,035; Seringehalt der Lösung: 7,89% Drehung im 0,865 dm-Rohr = — 0,64°.

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = -9{,}06^\circ$$

Fischer und Jacobs[1]) fanden, daß das synthetische l-Serin eine spezifische Drehung von — 6,87° besaß. Es ist augenscheinlich, daß die von uns erhaltene Substanz eine stärker linksdrehende Verunreinigung einschloß, wahrscheinlich Oxyprolin, welches eine Drehung von — 81,04°[2]) aufweist. Die genaue Analyse des Serinkupfersalzes müßte ein Vorhandensein von einer nur geringen Verunreinigung anzeigen; die Wahrscheinlichkeit besteht aber, daß die Drehung hauptsächlich von dem Serin selbst herrührt. Indessen konnte das aktive Serin nicht in krystallisierter Form gewonnen werden, so daß die Frage noch unentschieden ist. Wir beabsichtigen später darauf zurückzukommen.

Glykokoll aus dem Rückstande.

Nachdem die erste Serinfraktion gewonnen war, wurden die Mutterlaugen bis zu einem kleinen Volumen eingeengt und mit 12 g Pikrinsäure in gesättigter alkoholischer Lösung behandelt.

10 g Glykokollpikrat wurden gewonnen, was 2,47 g

---

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 39, 2948, 1906.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 35, 2620, 1902.

Glykokoll entspricht. Die umkrystallisierte Substanz schmolz bei 189°.

Analyse:

0,1199 g Substanz ergaben 19,2 ccm Stickstoff bei 21° und 756 mm (über 23%iger KOH.)

0,1673 g Substanz ergaben 0,1950 g CO_2 u. 0,0408 g H_2O.

	O	H	C
Gefunden:	31,79%	27,3%	18,12%
Berechnet $C_2H_5O_2N . C_6H_3O_7N_3$:	31,57%	26,5%	18,43%

Histidin, Arginin und Lysin.

Die Hexonbasen sind als Phosphorwolframate aus den Produkten der zweiten Hydrolyse gefällt worden. Drei Viertel des Niederschlages wurden von Phosphorwolframsäure befreit und verestert, um festzustellen, ob nachweisbare Mengen irgendwelcher Monoaminosäuren durch die Phosphorwolframsäure niedergerissen waren. Die Ergebnisse waren negativ, man erhielt nur Spuren von Ester.

Von den zurückbleibenden Phosphorwolframaten wurde eine Menge, die 43,0 g Wittepepton entsprach, zur Ermittelung der Hexonbasen nach Kossel und Patten[1]) benutzt.

Die Histidinlösung wurde auf 100 ccm verdünnt, und der Stickstoff in 20 ccm nach der Methode von Kjeldahl bestimmt. 12,06 ccm N/10-Schwefelsäure wurden verbraucht, entsprechend 0,325 g Histidin in 43 g Pepton, gleich 0,75%.

Die Argininlösung wurde auf 250 ccm verdünnt und 20 ccm für die Kjeldahl-Bestimmung genommen. 11,65 ccm von N/10-Schwefelsäure wurden neutralisiert, die 0,634 g Arginin oder 1,48% anzeigten.

Das Lysin wurde noch einmal als Phosphorwolframat gefällt und als Pikrat bestimmt. Es wurden 2,71 g Pikrat (= 1,06 g Lysin) oder 2,47% gewonnen.

Analyse:

0,1221 g Substanz ergaben 21,0 ccm Stickstoff bei 29° und 763 mm (über 23%iger KOH).

	N
Gefunden:	18,87%
Berechnet $C_{12}H_{17}O_9N_5$:	18,70%

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 38, 39, 1903.

Bei der im voraufgegangenen beschriebenen Analyse von Wittepepton wurden die folgenden Mengen an Aminosäuren aus 100 g Pepton gewonnen. Die Resultate von Brunner[1]) für Fibrin, die Muttersubstanz des Wittepeptons, sind hier zum Vergleiche mit angeführt:

	Wittepepton		Fibrin
Tyrosin	3,25		3,3
Glykokoll	0,78		2,2
Alanin	2,83		3,1
Valin und Leucin	14,70	Leucin	13,0
		Valin	vorhanden
Phenylalanin	2,60		1,2
Glutaminsäure	8,24		6,6
Asparaginsäure	1,70		1,7
Prolin	4,56		2,4
Oxyprolin	0,00		—
Serin	1,18		wahrscheinlich vorhanden
Histidin	0,75		—
Lysin	2,71		—
Arginin	1,48		—
Tryptophan	vorhanden		vorhanden
Gesamtausbeute:	47,78		33,5

[1]) Loc. cit.

Über Plastein.

Von

P. A. Levene und D. D. van Slyke.

(Aus dem Rockerfeller Institute for Medical Research, New York.)

(Eingegangen am 20. August 1908.)

Unter Plastein versteht man diejenige eiweißartige Substanz, die bei der Einwirkung von Enzymen auf konzentrierte Lösungen von hydrolytischen Eiweißspaltungsprodukten ausfällt. Die Möglichkeit, aus den Verdauungsprodukten solche Substanzen zu erhalten, wurde von Danilewski und Okunew im Jahre 1895 aufgefunden. Sie stellten fest, daß Lab die Bildung solcher Niederschläge in konzentrierten Albumoselösungen verursache. Man hat dieser Reaktion eine große Bedeutung beigelegt, da man sie als Beispiel einer Eiweißsynthese durch Enzyme auffaßte — reversible Verdauung. Der dem so entstandenen Produkte später beigelegte Name „Plastein" ist in dieser Arbeit akzeptiert worden.

Andere Forscher haben gefunden, daß verschiedene Enzyme die Fähigkeit besitzen, eiweißähnliche Substanzen aus Albumoselösungen zu fällen. Kurajeff[1]) erzielte positive Resultate mit Papayotin. Nürnberg[2]) erhielt plasteinerzeugende Enzyme aus Extrakten verschiedener autolysierter Organe von Schweinen, Hunden und Rindern, wobei sich Pankreasextrakt als am wirksamsten erwies. Herzog[3]) berichtete über das unzweifelhafte Auftreten synthetischer Prozesse in Albumoselösungen unter dem Einflusse von Pepsin und Trypsin; als Beweis dafür sah er die Zunahme der Viscosität solcher Lösung an.

---

[1]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **2**, 411, 1902.
[2]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **4**, 543, 1904.
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **39**, 305, 1903.

Taylor[1]) hat ungewöhnlich scharfe Resultate mit tryptischem Ferment aus der Leber Schizothaeries Nutallii, einer an der Küste des Stillen Ozeans vorkommenden Muschel, erzielt. Ein Protamin aus Roccus Lineatus wurde mit diesem Trypsin verdaut, bis Sättigung mit Chlornatrium keinen Niederschlag mehr ergab. Nach Konzentrieren der Verdauungslösung und Stehenlassen derselben mehrere Monate hindurch unter der Einwirkung desselben Enzyms bildete sich eine Substanz mit gleichen Eigenschaften und von gleicher Zusammensetzung wie das ursprüngliche Protamin. Robertson[2]) machte die Beobachtung, daß eine deutlich synthetische Einwirkung desselben Enzyms auf Caseoselösungen vorhanden sei. Zak[3]) glaubt proteosynthetische Wirkung mit „Pyocyanase"-Extrakt vom Bacillus pyocyaneus erzielt zu haben.

Über die Natur des Plasteins gehen die Ansichten der Forscher weit auseinander. Sawjalow[4]) betont die eiweißartige Beschaffenheit desselben und weist nach, daß es rückverdaut werden kann, und daß die Produkte der Rückverdauung alle Pickschen Albumosen enthalten. Insbesondere gerinnen die Plasteine sehr leicht. Nun weist Sawjalow als Schlußfolgerung aus seinen Versuchen darauf hin, daß die Verdauung im Magendarmkanal darin bestehe, aufgenommene Proteine zu spalten und sie zu einem für die Blutzirkulation geeigneten Eiweiß wieder aufzubauen. Mit diesem Eiweiß werden alsdann die Körperzellen ernährt, wahrscheinlich durch Koagulation der Substanzen an den betreffenden Stellen. In einer kürzlich erschienenen Mitteilung wiederholt Sawjalow diese seine Hypothese. Er findet, daß die einzelnen Fraktionen der Pickschen Albumosen, wenn sie sorgfältig gereinigt werden, keine Plasteine ergeben, sondern diese entstehen nur, wenn alle Fraktionen beisammen sind, sodaß also offenbar alle ursprünglichen Eiweißbestandteile notwendig sind, um Plastein zu bilden. Daß der Vorgang eine synthetischer war, ging ferner aus der Tatsache hervor, daß er die Schnelligkeit einer zwei- oder dreifach molekularen Reaktion besaß. Die chemische Identität der

[1]) Journ. of Biolog. Chem. 3, 87, 1907.
[2]) Journ. of Biolog. Chem. 3, 95, 1907.
[3]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 10, 284, 1907.
[4]) Pflügers Arch. 85, 171, 1901.

Plasteine verschiedener Herkunft erschien auf Grund der Tatsache als möglich, daß 19 von 30 Präparaten verschiedener Proteine beinahe dieselbe Zusammensetzung zeigten. Dieses Produkt mit einer durchschnittlich gleichen Zusammensetzung könnte (nach Sawjalows Hypothese) das für physiologische Resorption und Zirkulation gebildete Protein sein.

Die letzten Resultate Sawjalows, aus denen hervorgeht, daß Plastein nur aus dem vollständigen Hydrolysierungsgemische hervorgehen kann und daß Plastein alle Fraktionen der komplexen Proteine enthält, stimmen mit denen vieler anderer Forscher nicht überein. Lawrow und Salaskin[1]) gewannen nach einer früheren Mitteilung Plastein durch die Einwirkung von Lab auf die verschiedenen Pickschen Albumosen und sahen die Plasteine als albumoseartig und wahrscheinlich als Mischungen an. Es gelang D. Lawrow[2]), Koagulosen aus Verdauungsprodukten, denen ihre basischen Bestandteile durch Ausfällung mit Phosphorwolframsäure entzogen worden waren, zu erhalten. Diese Koagulosen ergaben bei der Hydrolyse keine basischen Spaltungsprodukte mehr. Daher können sie nicht zu der Klasse der komplexen Proteide gehören. Die Koagulose jedoch, die direkt aus Albumoselösungen gebildet wurde, lieferte basische Spaltungsprodukte, ein Beweis dafür, daß, wenn basische Gruppen vorhanden sind, sie mit in das Plastein hineingehen.

Kurajeff[3]) fand, daß Hetero- und Protofibrinose, auch Protocaseose, unter der Einwirkung von Lab kein Plastein ergaben, daß aber Deuterofibrinose und -caseose 3 bis 4⁰/₀ Plastein bildeten. In einigen Fällen, in denen neben Lab Papayotin zur Anwendung kam, rief in einer gegebenen Lösung das eine Enzym Plastein hervor, das andere versagte. In allen Fällen hatten die Plasteine einen höheren Kohlenstoff- und niedrigeren Stickstoffgehalt als die Albumosen, aus denen sie hervorgingen. Jedes Enzym schien einen bestimmten Teil des Verdauungsgemisches zu präcipitieren, und die daraus hervorgehenden Plasteine waren von den Mutteralbumosen verschieden.

Sacharow[4]) kam zu den obenerwähnten Ansichten Saw-

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 36, 277, 1902.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 53, 1, 1907.
[3]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol 2, 411, 1902.
[4]) Biochem. Centralbl. 1, 233, 1902.

jalows gerade entgegengesetzten Schlüssen. Sacharow sieht die Plasteine als die Produkte nicht einer Synthese, sondern einer weiteren Spaltung der Albumosen an, und diese Produkte werden bloß deshalb gefällt, weil die geeigneten Bedingungen, sie zu lösen, fehlen. Er stellte fest, daß ein aus Witteseher Peptonlösung durch Einwirkung von Papayotin gewonnener Niederschlag nach erneuter Auflösung durch gesättigte Ammoniumsulfatlösung nicht gefällt werden konnte.

Offenbar war die Fällung ein Pepton gewesen, welches deshalb aus der Lösung ausgeschieden wurde, weil die Alkalikonzentration, die notwendig gewesen wäre, um es gelöst zu halten, fehlte.

Bayers[1]) Schlußfolgerungen sind der Ansicht, daß Plastein ein regeneriertes Protein darstellt, noch radikaler entgegengestellt. Seine Experimente zeigen, daß die Muttersubstanz des Plasteins aus Wittepepton von verhältnismäßig einfachem Bau und in einer Mischung von Alkohol und Aceton löslich ist. Das aus dieser Substanz gewonnene Plastein gab kein Biuret-, Millon- und Xanthoproteinreaktionen und wies sehr niedrigen Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt auf (36,43 C und 8,05 N). Der Verfasser glaubt, daß die eiweißähnlichen Eigenschaften der Plasteine anderer Forscher die Folgen von Unreinlichkeiten sind.

Aus dieser Übersicht geht hervor, daß das Plastein nach den Ansichten der verschiedenen Forscher darstellen kann:

1. das ursprüngliche, aus seinen Spaltungsprodukten wieder aufgebaute Eiweiß.

2. eine synthetische Substanz eiweißartiger Natur, aber nicht das ursprüngliche Eiweiß.

3. gar keine synthetische eiweißartige Substanz, sondern bloß eines der einfachen, durch weitere Albumosenverdauung entstandenen Produkte.

Jedoch kann die chemische Erforschung keines der Plasteine, des Taylorschen aus verhältnismäßig einfachem Protamin ausgenommen, als vollständig angesehen werden. In keinem Falle ist eine Analyse der Spaltungsprodukte vorgenommen worden, und folglich ist unsere Kenntnis der Plasteine ebenso unsicher

---

[1]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 4, 554, 1904.

wie die der Proteine vor den Arbeiten von Fischer und anderen, die uns Methoden zur Bestimmung ihrer Bausteine angegeben haben. Die vorliegende Mitteilung bringt eine solche Analyse. Das Plastein wurde durch Einwirkung von Pepsin auf Wittepepton erzeugt.

Darstellung des Plasteins.

Ungefähr 140 g Plastein wurden wie folgt hergestellt:

2000,0 g Wittepepton wurden in genügend, 0,2 % Salzsäure enthaltendem Wasser aufgelöst, derart, daß eine 20 %ige Peptonlösung entstand. Zu dieser wurde eine Lösung von 25,0 g Fairchilds Pepsin gefügt, und diese Mischung blieb ungefähr 10 Tage bei Zimmertemperatur stehen. Nach Verlauf dieser Zeit hatte sich ein schweres Präcipitat abgesetzt. Die Mischung wurde nun mit einer gleichen Menge Wasser verdünnt und der Niederschlag durch Zentrifugieren gesammelt. Die Reinigung des Präcipitats wurde durch Waschen und Dekantieren, solange es möglich war, fortgesetzt. Nach einigem Waschen setzte sich das Präcipitat nicht mehr leicht zu Boden, sondern verblieb in einem Zustande der Suspension. Hier setzte die Reinigung mit 50 %iger Alkohollösung, fortschreitend mit 75 %igem und 95 %igem und endlich mit absolutem Alkohol und Äther ein.

Das Produkt ergab bei der Elementaranalyse folgende Daten, (die Prozentzahlen sind für den Gehalt an 1,06 % Asche korrigiert):

I. 0,1732 g Substanz ergaben 0,324 g CO_2 u. 0,1037 g H_2O.
II. 0,1453 g „ „ 0,2739 g CO_2 u. 0,0868 g H_2O.
III. 0,1484 g „ „ 18,5 ccm Stickstoff bei 16° und 754 mm (über 23 %iger KOH).
IV. 0,1441 g „ „ 18,6 ccm Stickstoff bei 19° und 759 mm (über 23 %iger KOH).
V. 0,6620 g „ „ 0,0729 g Bariumsulfat.
VI. 0,8270 g „ „ 0,0893 g Bariumsulfat.

	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	Durchschnitt.
C	51,64	51,96	—	—	—	—	51,70
H	6,76	6,74	—	—	—	—	6,75
N	—	—	14,89	14,97	—	—	14,93
S	—	—	—	—	1,50	1,53	1,52
O	—	—	—	—	—	—	25,10

Hydrolyse des Plasteins.

Übersicht.

Tyrosin, die esterifizierbaren Monoaminosäuren und die Hexonbasen wurden alle an ein und derselben Menge Plastein bestimmt. Dazu wurden 132,1 g trockene Substanz verwendet. Die Methode der Untersuchung war kurz folgende:

Das Plastein wurde mit 20 %iger Salzsäure hydrolysiert und der Hauptteil der Glutaminsäure als Hydrochlorid abgeschieden. Das Filtrat des Glutaminsäurehydrochlorides wurde durch Konzentrieren und Behandeln mit Bleioxyd und Silbersulfat von der Salzsäure befreit. Die Schwefelsäure wurde mit Bariumhydrat entfernt und das Tyrosin und der größte Teil des Leucins und Valins durch Krystallisation gewonnen. Darauf wurde ein aliquoter Teil des Filtrates (1/5) genommen und die Hexonbasen durch Phosphorwolframsäure gefällt. Die Hexonbasen des Niederschlages wurden nach den Methoden von Kossel und Patten[1]) analysiert. Das Filtrat wurde vom Überschusse des Fällungsmittels befreit, im Vakuum konzentriert und mit der Hauptlösung verestert. Die Ester wurden wie gewöhnlich im Vakuum destilliert und die Aminosäuren in den verschiedenen Fraktionen bestimmt.

Direkt erhaltene Glutaminsäure.

132,1 g Plastein wurden durch Kochen mit ungefähr 1 Liter 20 %iger Salzsäure hydrolysiert. Die Substanz erwies sich als ziemlich widerstandsfähig; denn mehr als 15 Stunden langes Kochen war notwendig, bis die Biuretreaktion negativ wurde. Die Lösung wurde auf ungefähr 400 ccm eingeengt, unter Kühlung mit Salzsäuregas gesättigt, mit Glutaminsäurehydrochlorid geimpft und dann 10 Tage bei 2° stehen gelassen. Die ungereinigte salzsaure Glutaminsäure wurde über Asbest abfiltriert, mit konzentrierter Salzsäure gewaschen und dann mit Barytlösung gekocht, um das Ammoniak zu vertreiben. Die Lösung wurde durch Schwefelsäure quantitativ von Barium befreit, auf 150 ccm eingeengt und mit HCl-Gas gesättigt. Das wieder auskrystallisierte und abgeschiedene Glutaminsäure-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 38, 39, 1903.

chlorhydrat wurde abfiltriert, mit konzentrierter Salzsäure gewaschen und im Vakuum über KOH bis zu konstantem Gewichte getrocknet. Das Produkt wog 11,28 g, war weiß und analysenrein.

Analyse:

0,2118 g Substanz verbrauchten 11,70 ccm $^{n}/_{10}$-$AgNO_3$;

	Cl
Gefunden:	19,59 %
Berechnet $C_5H_9O_4N.HCl$:	19,31 %

Tyrosin sowie krystallisierbares Leucin und Valin.

Die Filtrate von Glutaminsäurehydrochlorid wurden vereinigt und durch Eindampfen im luftverdünnten Raume zum Teil von HCl befreit. Darauf wurde die Lösung auf 6 Liter verdünnt und die Salzsäure möglichst mit Bleioxyd entfernt. Der Chlorgehalt wurde alsdann in einem aliquoten Teile der Lösung durch Titration bestimmt und Silbersulfat im geringen Überschuß hinzugefügt. Der Überschuß an Silber und Blei wurde durch H_2S und die Schwefelsäure durch eine entsprechende Menge Bariumhydrat entfernt. Das Filtrat war klar und nur leicht gelb gefärbt. Nun wurde es im Vakuum eingeengt, bis das Tyrosin zu krystallisieren begann. Es wurde abfiltriert und gewaschen, noch ehe die Lösung sich gänzlich abgekühlt hatte. Unter dem Mikroskop schien es bloß aus Tyrosinnadeln zu bestehen, und wirklich war es ohne Umkrystallisation analysenreines Tyrosin. Gewicht 3,0 g.

Analyse:

0,1376 g Substanz ergaben 0,3022 g CO_2 und 0,0763 g H_2O.

	C	H
Gefunden:	59,89 %	6,20 %
Berechnet $C_9H_{11}O_3N$:	59,67 %	6,08 %

Das Filtrat wurde nun wieder im Vakuum konzentriert, bis Krystallisation eintrat. Die Krystalle wurden wie die der folgenden Krystallanschüsse auf der Nutsche abfiltriert und mit 50 %igem Alkohol gründlich gewaschen. Das Produkt war nahezu weiß. Eine Kjeldahlbestimmung ergab, daß es 10,28 % Stickstoff enthielt. (Berechnet auf Leucin 10,69 %, auf Tyrosin 7,73 %.)

Das Filtrat des ersten Leucinanschusses blieb über Nacht im Eisschranke stehen. Es wurden noch 6,2 g rohes Leucin gewonnen. Dieser Teil ergab die Millonsche Probe auf Tyrosin. Um ihn von Tyrosin zu befreien, wurde er mit der ersten Portion vereinigt und umkrystallisiert, der zuerst ausgeschiedene Teil (3,5 g) enthielt das Tyrosin, das Filtrat ergab keine Millonsche Probe. Aus den 3,5 g der Leucin-Tyrosinmischung wurde noch 1,10 g reines Tyrosin durch Herauslösen des Leucins mit kochendem Alkohol und Essigsäure nach Habermann und Ehrenfeld und folgende Umkrystallisation gewonnen.

Analyse:

0,1181 g Substanz ergaben 0,2576 g CO_2 und 0,0639 g H_2O.

	C	H
Gefunden:	59,47 %	6,05 %
Berechnet $C_9H_{11}O_3N$:	59,67 %	6,08 %

Ein dritter Ansatz von 8,1 g rohem Leucin wurde aus der Mutterlauge der zweiten Fällung durch Konzentrieren und Krystallisierenlassen in der Kälte gewonnen. Er enthielt 10,82 % Stickstoff (nach Kjeldahl). Die Ausbeute an Rohleucin betrug in den drei Krystallanschüssen 16,54 g. Es war nicht rein, sondern die gewöhnliche Mischung von Leucin und Valin. Versuche, es durch teilweise Krystallisation zu reinigen, ergaben bloß eine Reihe von Mischkrystallen. Schließlich wurden die beiden Substanzen durch Trennung vermittels Bleiacetat und Ammoniak, ein schon früher von Levene[1]) angewandtes Verfahren, rein genug für die Analyse hergestellt. Es scheint jetzt, daß unter geeigneten Bedingungen die Mischung von Valin und Leucin einer angenähert quantitativen Trennung unterworfen werden kann.

3,20 g des Gemisches, 53,80 % Kohlenstoff und 9,51 % Wasserstoff enthaltend, wurden in ca. 20 ccm heißem, verdünntem Ammoniak aufgelöst und zu der Flüssigkeit Bleiacetat zugesetzt, solange ein Niederschlag von Leucinblei ausfiel. Das Präcipitat wurde durch Absaugen filtriert und Niederschlag und Filtrat getrennt durch H_2S zerlegt. Dann wurden die betreffenden Lösungen auf dem Dampfbade eingeengt. Die

[1]) Diese Zeitschr. 4, 307, 1907.

Rückstände wurden mit Alkohol ausgewaschen, um Ammoniumacetat zu entfernen. Aus dem Bleiniederschlage wurde 1,99 g Leucin mit 54,03 % C, 9,75 % H gewonnen. Nach dem Umkrystallisieren aus Wasser ergab es folgende Zahlen:

Analyse:

0,1126 g Substanz ergaben 0,2233 g CO_2 und 0,0984 g H_2O.

	C	H
Gefunden:	54,33 %	9,77 %
Berechnet $C_6H_{13}O_2N$:	54,92 %	9,99 %

Das Filtrat vom Leucinblei gab sogleich annähernd reines Valin; 1,02 g wurden davon gewonnen.

Analyse:

0,1348 g Substanz ergaben 0,2522 g CO_2 und 0,1114 g H_2O.

	C	H
Gefunden:	51,03 %	9,24 %
Berechnet $C_5H_{11}O_2N$:	51,24 %	9,47 %

Von den 3,20 g der Mischung wurden 3,01 g der beiden Aminosäuren zurückgewonnen. Die Trennung von Leucin und Valin hat früheren Forschern bei der Proteinhydrolyse die größten Schwierigkeiten bereitet, und wir beabsichtigen, diese Methode sorgfältig zu prüfen, um endgültig die Bedingungen, unter denen die Trennung am besten gelingt, festzustellen. Ein Überschuß an irgend einem der Reagentien scheint schädlich zu sein.

Esterifizierung.

Das Filtrat aus der krystallisierbaren Leucin-Valinfraktion wurde bis auf 250 ccm verdünnt. Eine Menge von 50 ccm wurde auf 700 ccm aufgefüllt, und die Hexonbasen mit Phosphorwolframsäure und Schwefelsäure gefällt. Der Niederschlag wurde in einer Buchnerschen Presse unter 300 kg Druck ausgepreßt. Das Filtrat wurde durch Barium von den Säuren befreit, mit der Hauptlösung vereinigt und im Vakuum eingeengt. Dann wurden die Aminosäuren dreimal mit Alkohol und Salzsäure auf die gewöhnliche Weise esterifiziert, die Ester mit Barium frei gemacht und so extrahiert, wie dies in unserer voraufgehenden Mitteilung angegeben ist. Der Rückstand wurde vom Barium befreit und nochmals verestert. Die

getrocknete Ätherlösung der vereinigten Ester wurde zuerst im Dampfbade, dann im Vakuum bei Zimmertemperatur eingeengt und darauf die Ester im Vakuum destilliert.

Beim Gebrauche der Gerykpumpe wurden die Ätherdämpfe usw. durch Schwefelsäure gebunden,[1]) statt nach der Fischer-Harriesschen Methode durch flüssige Luft kondensiert zu werden.

Fraktion	Temperat. d. Dämpfe	Temperat. d. Bades	Druck	Ausbeute an Estern
I.	bis 70°	bis 100°	20 mm	6,0 g
II.	„ 94°	„ 120°	20 bis 0,5 mm	16,6 g
III.	„ 110°	„ 145°	0,5 mm	9,3 g
IV.	„ 140°	„ 190°	0,5 mm	7,0 g
				38,9 g

Fraktion I (bei 70° unter 20 mm).

Diese Fraktion wurde durch fünfstündiges Kochen mit Wasser am Rückflußkühler verseift und ergab 1,5 g Aminosäuren. Sie wurden in absolutem Alkohol ausgekocht, um das Prolin zu entfernen, wodurch ihre Menge auf 1,2 g sank. Dieser Rückstand wurde in einigen ccm Wasser aufgelöst und filtriert. 0,2 g schwerlösliche Säure blieben dabei zurück. Zu der Lösung wurden 4 g Pikrinsäure in gesättigter alkoholischer Lösung gefügt. Beim Stehen fiel 0,67 g Glykokoll-pikrat (entsprechend 0,17 g Glykokoll) aus. Dasselbe wurde umkrystallisiert, indem es in heißem Wasser aufgelöst und mit Alkohol versetzt wurde; dann ließ man es stehen, bis die Krystallisation beendigt war. Das Pikrat schmolz bei 191° (cor.).

Analyse:

0,1111 g Substanz ergaben 0,1285 g CO_2 und 0,0293 g H_2O.

	C	H
Gefunden:	31,61 %	2,95 %
Berechnet $C_8H_8N_4O_9$:	31,57 %	2,65 %

Das Filtrat vom Glykokollpikrat wurde durch Schwefelsäure und Äther von der Pikrinsäure befreit und die α-Naphtylisocyanatverbindung der in Lösung befindlichen Aminosäure nach dem Verfahren von Neuberg und Manasse[2]) hergestellt.

[1]) Levene und van Slyke, diese Zeitschr. 10, 214, 1908

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 38, 2359, 1905.

0,85 g Isocyanat wurden erzielt, des sich als beinahe reines Glykokollisocyanat bei der Analyse erwies.

Analyse:

0,1251 g Substanz ergaben 0,2947 g CO_2 und 0,0595 g H_2O.

	C	H
Gefunden:	64,24 °/₀	5,22 °/₀
Berechnet $C_{13}H_{12}O_3N_2$:	63,90 °/₀	4,96 °/₀

Obgleich offenbar Glykokoll in der Isocyanatverbindung vorherrschte, war das letztere eine Mischung, die wahrscheinlich auch etwas Alanin enthielt. Die Substanz schmolz, nach Krystallisation aus verdünntem Alkohol bei 165°. Glykokoll-α-naphtylisocyanat schmilzt bei 191°, das l-Alaninderivat nach Neuberg und Manasse bei 202°. Die umkrystallisierte Substanz ergab analytische Daten für Kohlenstoff, die ungefähr in der Mitte zwischen denen für Glykokoll und Alanin lagen.

Analyse:

0,1390 g Substanz ergaben 0,3291 g CO_2 und 0,0713 g H_2O.

	C	H
Gefunden:	64,57 °/₀	5,46 °/₀
Berechnet für die Glykokollverbindung:	63,90 °/₀	4,96 °/₀
Berechnet für die Alaninverbindung:	65,05 °/₀	5,32 °/₀

Fraktion II (bei 94° unter 0,5 mm).

Zu den Estern dieser Fraktion wurde eine 3- oder 4fache Wassermenge gegossen und mit demselben Volumen Äther extrahiert, um den Leucinester zu entfernen. Die Ätherlösung wurde dreimal mit der gleichen Menge Wasser gewaschen. Die extrahierten und nichtextrahierten Ester wurden getrennt durch Kochen mit Wasser am Rückflußkühler verseift. Dann wurden die Aminosäuren auf dem Dampfbade getrocknet und mit absolutem Alkohol ausgezogen, um das Prolin zu entfernen. Die ätherlöslichen Ester ergaben 2,9 g rohes Leucin mit einem Kohlenstoffgehalt von 53,42 °/₀. Das Leucin für die Analyse wurde durch Fällung mit Bleiacetat aus der Lösung in Ammoniak gewonnen.

Analyse:

0,1195 g Substanz ergaben 0,2380 g CO_2 und 0,1079 g H_2O.

	C	H
Gefunden:	54,32 %	10,09 %
Berechnet $C_6H_{13}O_2N$:	54,92 %	9,99 %

Die in Alkohol unlöslichen Säuren aus den nicht extrahierten Estern wurden in einer kleinen Menge Wasser aufgelöst und einer fraktionierten Krystallisation unterworfen. Das Leucin war augenscheinlich durch die Ätherextraktion ganz entfernt worden. Die erste sich abscheidende Fraktion wurde mit einer kleinen Menge Wasser verrieben, um anhaftendes Alanin oder Glykokoll zu entfernen, und sie ergab sogleich richtige Analysenzahlen für Valin. Ihre Menge betrug 0,70 g.

Analyse:

0,1315 g Substanz ergaben 0,2486 g CO_2 und 0,1131 g H_2O.

	C	H
Gefunden:	51,57 %	9,62 %
Berechnet $C_5H_{11}O_2N$:	51,24 %	9,47 %

Aus den Mutterlaugen wurden noch 0,45 g Valin in weniger reiner Form gewonnen.

Kjeldahl-Bestimmung:

0,1592 g Substanz ergaben 13,97 ccm $^n/_{10}$-Schwefelsäure.

	N
Gefunden:	12,29 %
Berechnet $C_5H_{11}O_2N$:	11,96 %

Das Filtrat wurde eingeengt und der Rückstand aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert. 0,3 g Glykokoll wurden gewonnen, aber kein reines Alanin.

Analyse:

0,1158 g Substanz ergaben 0,1339 g CO_2 und 0,0685 g H_2O.

	C	H
Gefunden:	31,54 %	6,62 %
Berechnet $C_2H_5O_2N$:	31,97 %	6,73 %

Prolin.

Die alkoholischen Extrakte der Fraktionen I und II wurden auf dem Wasserbade eingeengt und mit kaltem absolutem Alkohol aufgenommen, wobei ein unlöslicher Teil zurückblieb. Nach Wiederholung dieser Behandlung war die Substanz völlig in Alkohol löslich. 3,37 g wurden dabei gewonnen. Zur Feststellung seiner Natur wurde es mit Bariumhydrat racemisiert und in das Kupfersalz verwandelt. Alsdann wurde das Salz noch einmal aus Wasser unkrystallisiert und an der Luft bis zum konstanten Gewichte getrocknet. Es hatte das charakteristische Aussehen des Prolinkupfersalzes und änderte beim Erhitzen seine Farbe von Blau in Violett.

Analyse:

0,3261 g lufttrockene Substanz ergaben 0,0361 g Gewichtsverminderung beim Erhitzen auf 110°.

0,2154 g lufttrockene Substanz ergaben 0,0414 g Kupfer bei der Elektrolyse.

	H_2O	Cu
Gefunden:	11,07 %	19,23 %
Berechnet $(C_5H_8O_2N)_2Cu + 2H_2O$:	10,99 %	19,40 %

Fraktion III (bei 110° unter 0,5 mm).

Der Phenylalaninester wurde wie gewöhnlich von den anderen durch Extraktion mit Äther getrennt und mit Salzsäure verseift. 1,07 g umkrystallisiertes Phenylalaninchlorhydrat wurden dabei gewonnen.

Analyse:

(Zu konstantem Gewicht über KOH getrocknet:) 0,1212 g Substanz verbrauchten 6,15 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$.

	Cl
Gefunden:	17,99 %
Berechnet $C_9H_{11}O_2N.HCl$:	17,58 %

Die nicht extrahierten Ester wurden durch Erhitzen mit Barytwasser verseift. Die Lösung wurde filtriert und blieb mehrere Tage in der Kälte stehen. 3,25 g asparaginsaures Barium, 2,13 g Asparaginsäure entsprechend, krystallisierten

aus. Die Asparaginsäure wurde durch die äquivalente Menge Schwefelsäure freigemacht und aus Wasser krystallisiert.

Analyse:

0,1416 g Substanz ergaben 0,1868 g CO_2 und 0,0626 g H_2O.

	C	H
Gefunden:	35,97 %	4,94 %
Berechnet $C_4H_7O_4N$:	36,06 %	5,30 %

Das Filtrat von dem asparaginsauren Barium wurde quantitativ vom Barium durch eine entsprechende Menge Schwefelsäure befreit und auf dem Dampfbade stark eingeengt. Dabe wurden 2,5 g eines Gemisches von Glutamin- und Asparaginsäure erhalten.

Analyse:

0,1066 g Substanz ergaben 0,1562 g CO_2 und 0,0550 g H_2O

	C	H
Gefunden:	39,45 %	5,64 %
Berechnet für $C_4H_7O_4N$:	36,06 %	5,30 %
Berechnet für $C_5H_9O_4N$:	40,80 %	6,12 %

Nach dem Kohlenstoffgehalt bestand das Gemisch aus 28,5 % oder zu 0,71 g Asparaginsäure und 1,79 g Glutaminsäure. Die Säuren wurden in einer kleinen Wassermenge aufgelöst und die Flüssigkeit mit Salzsäuregas gesättigt. Nachdem sie einige Zeit in der Kälte gestanden hatte, krystallisierte salzsaure Glutaminsäure aus. Sie wurde mit starker HCl gewaschen und im Vakuum über KOH getrocknet.

Analyse:

0,1714 g Substanz verbrauchten 9,48 ccm $n/_{10}$-$AgNO_3$.

	Cl
Gefunden:	19,61 %
Berechnet $C_5H_9O_4N.HCl$:	19,31 %

Das Filtrat wurde mit Silbersulfat von Salzsäure und mit Barium von Schwefelsäure befreit. Hierauf wurde die Lösung eingeengt und mit Kupferacetat behandelt. Nach 10 Tagen wurde das asparaginsaure Kupfer abfiltriert und an der Luft getrocknet. Der Kupfergehalt wurde elektrolytisch bestimmt.

0,1578 g Substanz ergaben 0,0359 g Cu.

		Cu
Gefunden:		22,75 %
Berechnet	$C_4H_5O_4NCu + 4^1/_2\ H_2O$:	23,06 %

Fraktion IV (bei 145° unter 0,5 mm).

Der Phenylalaninester wurde in üblicher Weise von den anderen durch Extraktion mit Äther getrennt und mit HCl verseift.

0,87 g umkrystallisiertes Phenylalaninhydrochlorid wurden gewonnen.

Analyse:

0,1145 g Substanz verbrauchten 5,79 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$.

		Cl
Gefunden:		17,93 %
Berechnet	$C_9H_{11}O_2N.HCl$:	17,58 %

Die nicht extrahierten Ester wurden mit Barytwasser verseift. Es konnte kein asparaginsaures Barium erhalten werden; daher wurde die Lösung mit der entsprechenden Menge Schwefelsäure quantitativ vom Barium befreit und eingeengt. 2,40 g unreine Glutaminsäure wurden dabei gewonnen. (41,87 % Cu, 5,64 % H, statt 40,80 % Cu, 6,12 % H). Sie wurde als salzsaures Salz aus gesättigt salzsaurer Lösung umkrystallisiert und dann im luftleeren Raume über KOH getrocknet.

Analyse:

0,1045 g Substanz verbrauchten 5,75 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$.

		Cl
Gefunden:		19,51 %
Berechnet	$C_5H_9O_4N.HCl$:	19,31 %

Der Rückstand der Ester, aus dem bei der Hydrolyse von Wittepepton Serin und Glykokoll rein dargestellt wurden, war leider verloren gegangen.

Histidin, Arginin und Lysin.

Die Hexonbasen, welche vorher als Phosphorwolframate aus einer 26,6 g Plastein enthaltenden Lösung gefällt worden waren, wurden mit Bariumhydrat freigemacht, der Überschuß an Barium durch eine entsprechende Menge Schwefelsäure entfernt und die Basen nach der Methode von Kossel und Patten analysiert.

Die Histidinlösung wurde auf 150 ccm verdünnt; 30 ccm Lösung verbrauchten bei einer Kjeldahlbestimmung 4,37 ccm $^{n}/_{10}$-Schwefelsäure; 40 ccm 5,91 ccm $^{n}/_{10}$-Schwefelsäure. Diese Daten geben, auf 150 ccm umgerechnet, 21,85 und 22,17 ccm; der Durchschnitt beträgt 22,01. Der Histidingehalt ist also = 0,114 g oder 0,43 %.

Die Argininlösung wurde auf ein Liter verdünnt. 50 ccm entsprachen nach eine Kjeldahlbestimmung 6,3 ccm $^{n}/_{10}$-Schwefelsäure. Arginin also 0,548 g oder 2,06 %.

Das Lysin wurde wieder als Phosphorwolframat gefällt und als Pikrat analysiert. 0,97 g wurden davon gewonnen. Lysin demnach = 0,378 g oder 1,42 %.

Analyse:

0,1329 g Substanz ergaben 23,0 ccm Stickstoff bei 28,5° und 761 mm (über 23 %iger KOH).

		N
Gefunden:		18,98 %
Berechnet	$C_{12}H_{17}O_9N_5$:	18,70 %

Tryptophan.

Die Anwesenheit dieser Aminosäure wurde nach dem Verfahren von Hopkins und Cole festgestellt.

Die Summe der isolierten Plasteinspaltungsprodukte ist unten angegeben. Die Brunnerschen Zahlen für Fibrin, die Muttersubstanz des Plasteins, sind zum Vergleiche angeführt.

	Aus 100 g Plastein		Aus 100 g Fibrin
Tyrosin	3,03		3,1
Glykokoll	0,50		2,2
Alanin	?		3,1
Valin und Leucin	15,59	Leucin Valin vorhand.	13,0
Phenylalanin	1,00		1,2
Glutaminsäure	10,02		6,8
Asparaginsäure	2,15		1,7
Prolin	2,55		2,4
Histidin	0,43		—
Arginin	2,06		—
Lysin	1,42		—
Tryptophan	vorhanden		vorhanden
	38,75		33,5

Von allen 13 Aminosäuren, auf welche hin geprüft worden war, wurde das Vorhandensein nachgewiesen mit Ausnahme von Alanin, das nicht rein isoliert wurde. Offenbar ist das Plastein eine Substanz, welche die Natur eines höchst komplexen Proteins besitzt und sich augenscheinlich in seiner Zusammensetzung nicht viel von dem Fibrin unterscheidet.

Jedoch ist es auf Grund dieser Ergebnisse noch nicht möglich, zu entscheiden, ob das Plastein ein Produkt der synthetisierenden Funktion des Enzyms oder eine geronnene Form einer der primären Fibrinalbumosen ist. Erst, wenn wir eine gründliche Kenntnis von der Zusammensetzung der Fibrinosen besitzen, wird es möglich sein, zu einem bestimmten Schlusse in bezug auf die wahre Natur der Plasteinbildung zu gelangen. Arbeiten in dieser Richtung sind zurzeit im Gange.

Zur Wertbestimmung der Katalasen und Oxydasen im Blut.

Zweite Mitteilung.

Von

Walther Löb und Paul Mulzer.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Rudolf-Virchow-Krankenhauses in Berlin.)

(Eingegangen am 10. September 1908.)

Mit 9 Figuren im Text.

Die in dieser Arbeit zusammengestellten Versuche sind nach den in der ersten Mitteilung[1]) angegebenen Methoden ausgeführt. Der größere Teil des dort dargelegten Untersuchungsprogramms wurde mittels der „Volummethode" in Angriff genommen, die später ausgearbeitete „Druckmethode" konnte bisher erst bei relativ wenigen Versuchen zur Verwendung gelangen.

Versuche mittels der Volummethode.

Bei den Vorversuchen, die der ersten Orientierung dienten, wurden die äußeren physikalischen Bedingungen noch nicht exakt festgelegt, sondern bei der von 20 bis 24° schwankenden Zimmertemperatur gearbeitet. Es kam zunächst darauf an, festzustellen, ob überhaupt ein scheinbares Gleichgewicht[2]) erzielt werden konnte, ob also die Sauerstoffentwicklung vor der völligen Zersetzung des H_2O_2 auf Null heruntergeht.[3]) Wie aus

[1]) Diese Zeitschr. 13, 339, 1908.

[2]) Siehe die erste Mitteilung.

[3]) Senter erwähnt (Zeitschr. f. physik. Chem. 44, 271, 1903), daß der baldige Stillstand der Katalyse bei Anwendung von wenig Blut und starkem H_2O_2 und die gleichzeitige Entfärbung der Lösung auf Oxydation des Katalysators beruhen. Sollte diese Vermutung richtig sein, so würde

Tabelle I ersichtlich, ist das bei genügendem Überschuß an H_2O_2 und genügender Kleinheit der Blutmenge der Fall. Als Kriterium für den Eintritt des scheinbaren Gleichgewichtes wählten wir das Auftreten bzw. das Ausbleiben der Sauerstoffentwicklung bei erneutem Zusatz von Blut zu dem benutzten H_2O_2. Nur eine beträchtliche Neuabspaltung von Sauerstoff, wie sie in Versuch 3 auftrat, betrachten wir als sicheres Kennzeichen für die Erreichung jenes Zustandes.

Da die Ausführungsform der Methode von der Sicherheit, mit der sich dieser Punkt treffen läßt, maßgebend bestimmt ist, so haben wir bei einer größeren Anzahl von Versuchen die Gleichgewichtsprobe ausgeführt, bei Wahl geeigneter Verhältnisse stets mit positivem Erfolge.

Tabelle I.

Nr.	Zeit nach Einfallen des Schälchens	Ent-wick. Gas ccm	Differenz der Ablesung	H_2O_2	Blut	Bemerkungen
1.	0′	0	0	50 ccm H_2O_2-Lsg. 10 Vol.-% (neutral) auf 250 ccm mit H_2O verdünnt. Von der Mischung 25 ccm = 50 ccm O_2	3 Tropfen unverdünnten defibrinierten Kaninchenblutes. (Mittels Pipette der Ohrvene entnommen)	Weiterer Zusatz von Blut (2 Tropfen) verursachte noch geringe Gasentwicklung. Das H_2O_2 war schon nach 9 Min. größtenteils versetzt
	2′	20,2	20,2			
	7′	44,2	24,0			
	8′	44,24	0,04			
	9′	44,24	0			
	10′	44,24	0			
	11′	44,24	0			
2.	0′	0	0	do.	1 Tropfen des Blutes von Versuch 1	Weiterer Blutzusatz (1 Tropfen) ruft noch geringe Gasenwicklung hervor. Verhältnisse wie bei 1
	2′	13,4	13,4			
	4′	22,8	9,4			
	9′	31,4	8,6			
	14′	38,0	6,6			
	19′	44,0	6,0			
	20′	44,1	0,1			
	21′	44,5	0,4			
	22′	44,5	0			
	24′	44,5	0			

das scheinbare Gleichgewicht hier durch einen Oxydationsprozeß veranlaßt sein, der (vgl. die Versuche) eine gleichartige und von denselben Faktoren abhängige Reaktionshemmung hervorruft, wie eine Gegenwirkung der Reaktionsprodukte gegen die ursprüngliche Richtung der Reaktion (vgl. S. 484).

Tabelle I (Fortsetzung).

Nr.	Zeit nach Einfallen des Schälchens	Ent-wick. Gas ccm	Differenz der Ablesung	H_2O_2	Blut	Bemerkungen
3.	0′	0	0	100 ccm H_2O_2-Lsg. 10 Vol.-% auf 250 ccm mit H_2O verdünnt. 25 ccm = 100 ccm O_2	1 Tropfen des Blutes von Versuch 1	Versuch bei Zimmertemperatur. Nach weiterem Blutzusatz findet noch starke Gasentwicklung statt (in 4 Minuten 11,4 ccm)
	2′	26,1	26,1			
	5′	45,3	19,2			
	10′	58,8	13,5			
	15′	66,4	7,6			
	25′	70,6	4,2			
	30′	70,6	0			
	45′	70,6	0			

Bei den in Tabelle II zusammengestellten Versuchen wurde die in Versuch 3 als für unsere Zwecke ausreichend erkannte H_2O_2-Konzentration durchgängig gewählt und der Form und Menge des Blutzusatzes Aufmerksamkeit geschenkt.

Es zeigte sich, daß die absoluten Mengen des entwickelten Sauerstoffs auch unter anscheinend gleichen Bedingungen, chemischen sowohl wie physikalischen, große Abweichungen zeigen, wenn auch die Form der Zeitumsatzkurve annähernd gleich bleibt. Wir vermuteten die Ursache daher im Blut und wählten, um dieser Frage näher zu kommen, weit geringere Blutmengen und Konzentrationen, wobei die Werte sogleich größere Übereinstimmung aufwiesen. (Versuch 8 und 9, Tabelle II.)

Tabelle II.

Nr.	Zeit nach Einfallen des Schälchens	Ent-wick.-Gas ccm	Differenz der Ablesung	H_2O_2	Blut	Badtemperatur	Ablesetemperatur	Barometerstand mm	Bemerkungen
4.	0′	0	0	100 ccm H_2O_2-Lsg. 10 Vol.-% auf 250 ccm mit H_2O_2 verdünnt. Von dieser Mischung 25 ccm	1 Tropfen defibrinierten Kaninchenblutes (mittels Pipette der Ohrvene entnommen)	39°	20°	749	1 Tropfen Blut entwickelt nach Beendigung des Versuches in 10′ weitere 13 ccm Gas
	2′	13,2	13,2						
	5′	21,6	8,4						
	10′	23,0	1,4						
	15′	24,6	1,6						
	20′	24,8	0,2						
	25′	25,2	0,4						
	30′	25,4	0,2						
	32′	25,5	0,1						
	34′	25,6	0,1						
	35′	25,8	0,2						
	36′	25,8	0						

Tabelle II (Fortsetzung).

Nr.	Zeit nach Einfallen des Schälchens	Ent-wick.-Gas ccm	Differenz der Ablesung	H_2O_2	Blut	Badtemperatur	Ablese-temperatur	Barometer-stand mm	Bemerkungen
5.	0′	0	0	do.	do.	39°	20°	749	
	2′	27,0	27,0		(Dasselbe Tier)				
	12′	42,0	15,0						
6.	0′	0	0	do.	Blut desselben	39°	20°	749	1 Tropfen
	5′	35,4	35,4		Tieres wie oben				später noch zu-
	10′	38,6	3,2		(1 Tropfen)				gesetzten Blu-
	13′	39,5	0,9						tes entwickelt
	18′	39,5	0						nach 5′ 28 ccm
	20′	39,5	0						Gas
7.	0′	0	0	do.	do.	39°	20°	759	1 Tropfen Blut
	4′	43,1	43,1						entwickelt
	14′	47,3	4,2						später nach 10′
	19′	47,3	0						noch 40 ccm Gas
8.	0′	0	0	do.	0,1 ccm defibri-	38°	18,5°	749	0,1 ccm dieser
	3′	1,6	1,6		nierten Ohrve-	bis			Blutlösungen
	6′	2,2	0,6		nenblutes eines	39°			nach Stillstand
	11′	2,4	0,2		Kaninchens mit				des Prozesses
	16′	3,0	0,6		10 ccm Aq. dest.				noch zugesetzt
	21′	3,6	0,6		in sterilem Schäl-				entwickelt nach
	26′	4,2	0,6		chen vermischt.				10′ noch 28 ccm
	30′	4,5	0,3		Davon 0,05 ccm zum Versuch verwendet				Gas
9.	0′	0	0	do.	do.	39°	19°	749	
	2′	1,0	1,0						
	5′	1,8	0,8						
	10′	2,8	1,0						
	15′	4,4	1,6						
	20′	4,4	0						
	25′	4,8	0,4						
	30′	5,1	0,3						

Nachdem durch diese Vorversuche erwiesen war, daß für unsere Absichten die geeignetsten Bedingungen bei verhältnismäßig hoher H_2O_2-Konzentration und geringer Blutkonzentration liegen, gingen wir zu der Ausführung exakterer Versuche über. Aus dem obigen Beobachtungsmaterial schien es möglich, auch in die physikalisch-chemische Seite des Vorgangs Einblick zu erhalten durch die Feststellung, ob die Reaktionskinetik der

H_2O_2-Zersetzung durch Blut den von Senter[1]) für die Hämase gefundenen Beziehungen entspricht, oder ob bereits in dem Zersetzungsbild das Mitwirken einer Oxydase sich bemerkbar macht. Wenn man auch den Oxydasen die allgemeine Enzymeigenschaft, H_2O_2 zu zersetzen, zuschreiben kann, so ist es doch ungewiß, ob diese Eigenschaft in Gegenwart des Blutes zur Erscheinung kommt. Denn das Blut selbst kann Depolarisatoren für aktivierten Sauerstoff enthalten. Diese Möglichkeit läßt sich durch Wahl sehr geringer Blutmengen einschränken, so daß auch die später zu erörternde Depolarisatorenfrage die in den letzten Versuchen benutzten Bedingungen rechtfertigt.

Zur Charakteristik des verschiedenen Verhaltens bei Verwendung von viel und wenig Blut geben wir die Zeit-Umsatzkurven der Versuche 4 und 8 (Tabelle II).

Wie aus Fig. 1 ersichtlich, ist bei hoher Blutmenge, d. h. bei großer Enzymkonzentration die anfängliche H_2O_2-Zersetzung eine ungemein starke, um nach etwa 10 Minuten den allmählich abklingenden Verlauf anzunehmen, der bei geringer Blutkonzentration nach einem viel schwächeren ursprünglichen Anstieg alsbald einsetzt.

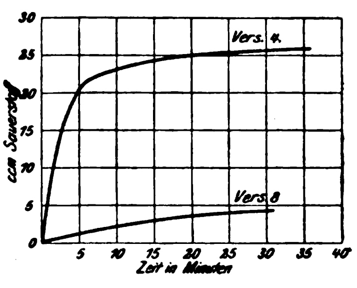


Fig. 1.

Senter[2]) hat festgestellt, daß die Hämasekatalyse des H_2O_2 in erster Anordnung eine Reaktion erster Ordnung darstellt, daß also die Reaktion proportional der jeweiligen H_2O_2-Konzentration verläuft. Die Zersetzungsgeschwindigkeit ist demnach:

$$\frac{dC}{dt} = k_1 C_t$$

oder

$$k_1 = \frac{1}{t_2 - t_1} \ln \frac{C_1}{C_2} \text{ oder } 4343\, k_1 = \frac{1}{t_2 - t_1} \log \frac{C_1}{C_2},$$

wobei C_1 und C_2 die H_2O_2-Konzentrationen bei zwei aufeinanderfolgenden Beobachtungen und $t_2 - t_1$ die inzwischen verstrichene Zeit bedeuten. C_t ist die H_2O_2-Konzentration zu einer be-

[1]) Zeitschr. f. physik. Chem. 44, 257, 1903.

[2]) l. c.

liebigen Zeit t. Senter konnte die ungefähre Konstanz von k_1 nachweisen. Da seine Messungen bei 0° in verdünnten H_2O_2-Lösungen durch Titration mit $KMnO_4$ ausgeführt sind, so ist selbstverständlich ein Vergleich der absoluten Werte ausgeschlossen; immerhin ließ sich feststellen, ob eine Konstanz von k_1 auf eine vorwiegende Wirksamkeit der Hämase schließen ließ.

Zur Verwertung der experimentellen Daten ist eine Umrechnung notwendig. Das verwandte reine H_2O_2 war nahezu genau 10 Vol.-%, d. h. 100 ccm der Lösung gaben bei vollständiger Zersetzung 1000 ccm Sauerstoff. Da in den Versuchen 100 ccm H_2O_2 auf 250 ccm aufgefüllt waren und von dieser Mischung je 25 ccm zur Zersetzung gelangten, so war die Anfangskonzentration, auf den abspaltbaren Sauerstoff bezogen 100 ccm; von diesem Wert mußten die entwickelten Mengen abgezogen werden, um die jeweiligen H_2O_2-Konzentrationen, ausgedrückt durch den abspaltbaren Sauerstoff in ccm, zu erhalten. Bei dieser Überschlagsrechnung wurde von einer Reduktion der geringen Gasmengen auf die Normalzustände abgesehen und ebenso etwaigen Übersättigungserscheinungen keine Rechnung getragen.

Die Daten für die beiden herausgegriffenen Versuche sind die folgenden:

Tabelle III.

Versuch 4			Versuch 8		
t (Min.)	$C_{H_2O_2}$	4343 k_1	t (Min.)	$C_{H_2O_2}$	4343 k_1
0	100	—	0	100	—
2	86,8	307	3	98,4	23,3
5	78,4	147	6	97,8	8,9
10	77,0	156	11	97,6	1,8
15	75,4	182	16	97,0	5,4
20	75,2	23	21	96,4	5,4
25	74,8	46	26	95,8	5,4
30	74,6	93	30	95,5	2,7

Wie man sieht, ist die Geschwindigkeitskonstante von der Blutkonzentration in hohem Maße abhängig, jedoch ist in Versuch 4 keinerlei Konstanz bemerkbar, während in Versuch 8 eine zeitweise Annäherung an eine Reaktion erster Ordnung unverkennbar ist. Wir werden auf diese Werte noch bei anderen Versuchen eingehen.

In der folgenden Tabelle geben wir eine Übersicht über einige Versuche, die in gleichbleibender Menge H_2O_2 wechselnde Mengen Blut enthalten. Da wir beobachtet hatten, daß verschiedene Tiere (es kamen nur Kaninchen zur Verwendung) ungleiche Werte gaben, so haben wir bei den folgenden Versuchen, wenn nichts anders bemerkt ist, stets bei dem gleichen Tier in gleichbleibender Weise das Blut entnommen.

Tabelle IV.

Nr.	Zeit nach Einfallen des Schälchens	Entwick. Gas ccm	Differenz der Ablesung	H_2O_2	Blut	Badtemperatur	Ablesetemperatur	Barometerstand mm	Bemerkungen
10.	0′	0	0	110 ccm H_2O_2-Lsg. 10 Vol.-% auf 250 ccm mit H_2O verdünnt. Von dieser Mischung 25 ccm	Ohrvene eines Kaninchens durch Einstich eröffnet. Von dem frischquellenden Blut im Melangeur bis Marke 1 aufgesaugt, dann sofort Aq. dest. bis 101 (also Blut 100-fach verdünnt). Nach kräftigem Durchschütteln wird die völlig homogene Lösung der Ampulle — Blutgerinnsel sind peinlich zu vermeiden! — in ein Uhrschälchen geblasen. Von dieser Mischung 0,05 ccm zum Versuch	39°	19°	753	Unmittelbar nach Einwerfen des Schälchens in die Lösung wird einmal kräftig umgeschüttelt und dann der Apparat ruhig sich selbst überlassen
	1′	4,0	4,0						
	5′	5,0	1,0						
	10′	6,5	1,5						
	15′	8,4	1,9						
	20′	9,4	1,0						
	25′	10,2	0,8						
	30′	10,9	0,7						
	35′	11,4	0,5						
	40′	12,3	0,9						
	45′	13,0	0,6						
	50′	14,7	1,7						
	55′	14,2	0,5						
	60′	14,8	0,2						
	—	—	—						
	2h	20,6	5,8						
	2h5′	21,0	0,4						
11.	0′	0	0	do.	0,05 ccm obiger Mischung, jedoch Blut eines anderen Kaninchens	39°	20°	758	do.
	2′	2,4	2,4						
	5′	3,6	1,2						
	10′	5,2	1,6						
	15′	6,4	1,2						
	20′	7,6	1,2						
	25′	8,6	1,0						
	30′	9,4	0,8						
	35′	10,2	0,8						
	40′	10,8	0,6						
	45′	11,6	0,8						
	50′	12,2	0,6						
	55′	13,0	0,8						
	60′	13,6	0,6						

Tabelle IV (Fortsetzung).

Nr.	Zeit nach Einfallen des Schälchens	Entwick. Gas ccm	Differenz der Ablesung	H_2O_2	Blut	Badtemperatur	Ablesetemperatur	Barometerstand mm	Bemerkungen
12.	0′	0	0	do.	0,1 ccm dieser Mischung; frische Blutentziehung bei demselben Kaninchen wie in Versuch 11	39°	20°	758	do.
	1′	5,4	5,4						
	5′	7,4	2,0						
	10′	9,0	1,6						
	15′	10,6	1,6						
	20′	11,4	0,8						
	25′	12,2	0,8						
	30′	12,6	0,4						
	35′	13,3	0,7						
13.	0′	0	0	do.	0,1 ccm derselben Mischung von dem gleichen Kaninchen, aber am folgenden Tag aus der Ohrvene entnommen	39°	20°	758	do.
	1′	3,2	3,2						
	5′	9,8	6,6						
	10′	11,6	1,8						
	15′	13,4	1,8						
	20′	14,2	0,8						
	25′	15,0	0,8						
	30′	15,5	0,5						
14.	0′	0	0	100 ccm H_2O_2-Lsg. 10 Vol.-% auf 250 ccm mit H_2O verdünnt. Von dieser Mischung 25 ccm	0,1 ccm der üblichen Blutmischung, aber neues Tier	38,5°	19,5°	758	Unmittelbar nach Einwerfen des Schälchens in die Lösung wird einmal kräftig umgeschüttelt und dann der Apparat ruhig sich selbst überlassen
	1′	2,3	2,3						
	6′	8,6	6,3						
	11′	10,6	2,0						
	16′	11,8	1,3						
	21′	12,6	0,8						
	26′	13,4	0,8						
	31′	14,0	0,6						
	36′	15,0	1,0						
15.	0′	0	0	do.	do. (dasselbe Tier)	39°	19,5°	758	do.
	1′	4,0	4,0						
	6′	9,2	5,2						
	11′	11,2	2,0						
	16′	12,4	1,2						
	21′	13,2	0,8						
	26′	14,0	0,8						
	31′	14,8	0,8						
	36′	15,4	0,6						
	41′	16,0	0,6						
	46′	16,4	0,4						
	51′	16,8	0,4						
	56′	17,4	0,6						
	61′	17,8	0,4						

Tabelle IV (Fortsetzung).

Nr.	Zeit nach Einfallen des Schälchens	Ent-wick. Gas ccm	Differenz der Ablesung	H_2O_2	Blut	Badtemperatur	Ablese-temperatur	Barometer-stand mm	Bemerkungen
16.	0′	0	0	do.	do.	39°	20°	758	do.
	1′	5,2	5,2		(Neues Tier;				
	6′	13,8	8,6		Blut aus linker				
	11′	15,4	1,6		Ohrvene ent-				
	16′	16,4	1,0		nommen)				
	21′	17,2	0,8						
	26′	18,0	0,8						
	31′	18,6	0,6						
	36′	19,0	0,4						
	41′	19,4	0,4						
	46′	20,0	0,6						
	51′	20,4	0,4						
	56′	21,0	0,6						
	61′	21,4	0,4						
17.	0′	0	0	do.	do.	39°	19°	758	do.
	1′	5,2	5,2		(Blut desselben				
	6′	12,8	7,6		Tieres, jedoch				
	11′	14,8	2,8		aus rechter				
	16′	16,0	1,2		Ohrvene)				
	21′	17,0	1,0						
	26′	17,8	0,8						
	31′	18,4	0,6						
	36′	19,0	0,6						
	41′	19,4	0,4						
	46′	20,4	0,6						
18.	0′	0	0	do.	do.	39°	20°	758	do.
	1′	5,2	5,2		(Blut eines				
	6′	11,2	6,0		neuen Tieres aus				
	11′	13,0	2,0		der linken				
	16′	13,8	0,8		Ohrvene)				
	21′	14,8	1,0						
	26′	15,6	0,8						
	31′	16,2	0,6						
	36′	16,6	0,4						
	41′	17,2	0,6						
	46′	17,6	0,4						

Aus den angeführten Daten geht hervor, daß die Geschwindigkeit der H_2O_2-Zersetzung in hohem Maße von der Blutmenge bestimmt ist. Vor allem ist, wie bereits erwähnt, der anfängliche Anstieg der Zersetzung bei höheren Blutkonzentrationen viel steiler als bei niedern. Im Zusammenhang mit der verhältnismäßig geringen Menge des jeweilig abgeschiedenen Sauerstoffs bei sehr geringem Blutzusatz steht die Tatsache, daß ein scheinbares Gleichgewicht erst spät erreicht wirrd. Bei diesen Versuchen, die der Untersuchung der Zeitumsatzkurven dienten, wurde auf die Durchführung der Beobachtung bis zum Punkte des Stillstandes der Zersetzung kein Wert gelegt. Deshalb sind die Daten nur für bestimmte Zeiträume angeführt. Die eingangs wiedergegebene Vermutung Senters, daß der Reaktionsstillstand durch Oxydation der Blutkatalase selbst veranlaßt sei, findet in diesen Versuchen keine Stütze.

Die Wirkung der höheren Blutkonzentration geht auch hier besonders deutlich aus den Kurven hervor: bei den Versuchen 10 und 11 (0,05 ccm Blutmischung) ein sehr allmählicher Anstieg vom Beginn der Zersetzung an, bei den Ver-

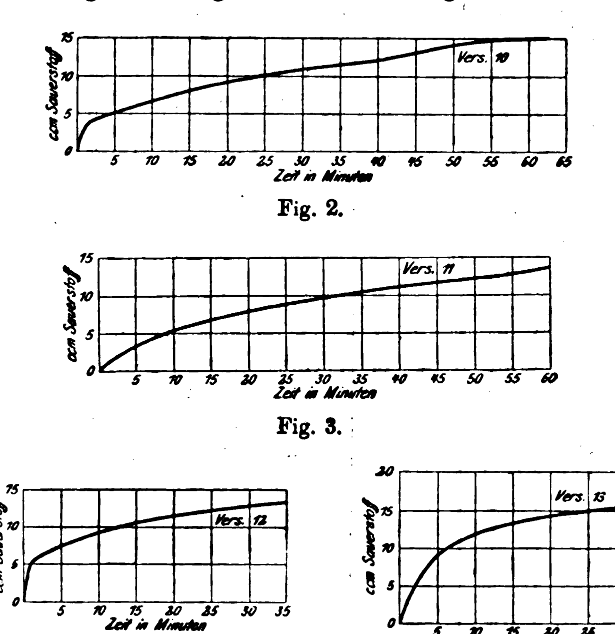


Fig. 2.

Fig. 3.

Fig. 4.

Fig. 5.

suchen 12 und 13 (0,1 ccm Blutmischung) zunächst ein steileres Ansteigen und erst später der Übergang in die normale Form. (Fig. 2 bis 5.)

Die Geschwindigkeitskonstanten dieser Versuche, aus der Formel für monomolekulare Reaktionen berechnet, zeigen einen ausgesprochenen Gang und weisen nicht annähernd die von Senter bei der Hämase beobachtete Konstanz auf. Höchstens könnte man wieder, wie bei den für die Versuche 7 und 8 bereits angegebenen Daten eine zeitweise Annäherung an eine Reaktion erster Ordnung bemerken, eine Erscheinung, die aber bei der zweifellosen Kompliziertheit der fraglichen Enzymwirkungen zu keinerlei weiteren Schlüssen berechtigt. Nur hypothetisch läßt sich aus den Störungen des Verlaufs die Meinung aussprechen, daß an dieser H_2O_2-Zersetzung durch Blut außer den Katalasen noch andere Enzyme (Oxydasen) beteiligt sein müssen, weil ja für die Blutkatalase, die Hämase, die katalytische Beeinflussung gemäß einer Reaktion erster Ordnung erwiesen ist.

Wir lassen die Werte für einige Versuche folgen:

Tabelle V.

Versuch 11 0,05 ccm Blutmischung			Versuch 12 0,1 ccm Butmischung			Versuch 13 0,1 ccm Blutmischung			Versuch 15 0,1 ccm Blutmischung (neues Tier)		
t (Min.)	$C_{H_2O_2}$	4343 K_1	t	$C_{H_2O_2}$	4343 K_1	t	$C_{H_2O_2}$	4343 K_1	t	$C_{H_2O_2}$	4343 K_1
0	100	—	0	100	—	0	100	—	1	96,0	—
2	97,6	1,79	1	94,6	—	1	96,8	—	6	90,8	—
5	96,4	1,45	5	92,6	—	5	90,2	7,67	11	88,8	1,93
10	94,8	1,11	10	91,0	1,51	10	88,4	1,75	16	87,6	1,18
15	93,6	1,12	15	89,4	1,54	15	86,6	1,78	21	86,8	0,79
20	92,4	0,94	20	88,6	0,78	20	85,8	0,81	26	86,0	0,80
25	91,4	0,76	25	87,8	0,79	25	85,0	0,81	31	85,2	0,81
30	90,6	0,77	30	87,4	—	30	84,5	0,51	36	84,6	0,61
—	—	—	35	86,7	0,69	—	—	—	41	84	0,61

Die schon früher von mehreren Forschern erwähnte Beobachtung, daß der Katalasenwert des Blutes mit der Tierindividualität schwankt, konnten wir, wie die Versuche 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 zeigen, bestätigen. Aus den (Fig. 6) Kurven erhält man den Eindruck, als seien dem H_2O_2 verschiedene Blutmengen zugesetzt worden, während es sich um gleiche Blutmengen, jedoch von zwei Kaninchen handelt. Jedenfalls

liegt es nahe, anzunehmen, daß diese Verschiedenheit in dem Wechsel der Konzentration des Blutes an Enzymen begründet ist, und es erhebt sich die weitere Frage, ob in dem Blut selbst ein meßbarer Faktor enthalten ist, dem die Enzym-

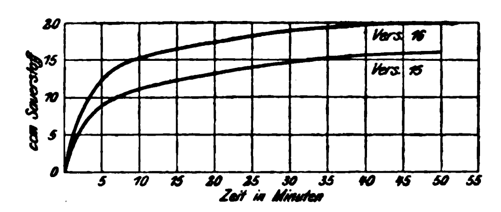


Fig. 6.

konzentration, die selbst nicht bestimmbar ist, annähernd proportional bleibt. In erster Linie wurde die Aufmerksamkeit auf die Menge der Erythrocyten gelenkt, die vielfach als Träger der Blutkatalasen und Oxydasen angesehen werden. Wir kommen darauf weiter unten zurück. Das Blut aus den beiden verschiedenen Ohrvenen (Versuche 16 u. 17) verhält sich nahezu gleich.

Die Angaben von Jolles[1]), daß venöses und arterielles Blut desselben Tieres gleiche Katalasenzahl besitzt, entsprechen auch unsern Resultaten. Die Unterschiede in den Sauerstoffwerten sind, wie aus der folgenden Tabelle hervorgeht, nur geringfügig.

Tabelle VI.

Nr.	Zeit nach Einfallen des Schälchens	Entwick. Gas ccm	Differenz der Ablesung	H_2O_2	Blut	Badtemperatur	Ablesetemperatur	Barometerstand mm	Bemerkungen
19.	0′	0	0	100 ccm	0,1 ccm der	39°	18°	758	
	1′	3,2	3,2	H_2O_2-Lsg.	üblichen				
	6′	11,0	7,8	10 Vol.-%	Lösung				
	11′	13,4	2,4	auf	(Neues				
	16′	14,8	1,4	250 ccm	Tier,				
	21′	15,8	1,0	mit H_2O	linke				
	26′	16,6	0,8	verdünnt.	Ohr-				
	31′	17,4	0,8	Von dieser	vene)				
	36′	18,0	0,6	Mischung					
	41′	18,4	0,4	25 ccm					
	46′	19,0	0,6						

[1]) Fortschritte der Medizin 22, 1229, 1904.

Tabelle 6 (Fortsetzung).

Nr.	Zeit nach Einfallen des Schälchens	Entwick. Gas ccm	Differenz der Ablesung	H_2O_2	Blut	Badtemperatur	Ablesetemperatur	Barometerstand mm	Bemerkungen
20.	0′	0	0	do.	do.	39°	19°	758	
	1′	2,8	2,8		(Blut				
	6′	10,2	7,4		durch				
	11′	11,6	1,4		Herzpunk-				
	16′	13,0	1,4		tion des-				
	21′	14,0	1,0		selben				
	26′	15,0	1,0		Tieres ge-				
	31′	15,8	0,8		wonnen,				
	36′	16,4	0,6		rein				
	41′	17,0	0,6		arteriel-				
	46′	17,6	0,6		les Blut)				

Versuche mit Sauerstoffdepolarisatoren.

Um zu erfahren, ob oxydable Substanzen in der Lage sind, einen Teil des durch die Blutkatalyse aus H_2O_2 entwickelten Sauerstoffs zu binden, verfuhren wir in der Weise, daß wir unter gleichen Bedingungen die Zersetzung einmal in Gegenwart der Depolarisatorlösung, dann nach Ersatz derselben durch reines Lösungsmittel (Wasser oder Kochsalzlösung) ablaufen ließen. Daß H_2O_2 allein nicht oxydierend auf die angewandten Stoffe wirkt, ließ sich in den meisten Fällen leicht direkt nachweisen; aber auch eine teilweise Oxydation durch H_2O_2 würde nicht nachteilig oder irreführend auf die Resultate gewirkt haben, da es darauf ankam, die Absorption des aus H_2O_2 entwickelten Sauerstoffs festzustellen. Bei positivem Ausfall dieser Probe konnte eine direkte Einwirkung des flüssigen H_2O_2 nur den Anteil des absorbierbaren Sauerstoffs verringert haben, wodurch die Beweiskraft des Versuchs natürlich nicht herabgesetzt wird.

Benzidin wird durch Wasserstoffperoxyd nicht angegriffen. Blutzusatz ruft in essigsaurer Lösung Oxydation und Blaufärbung hervor, eine Reaktion, die in letzter Zeit neben der Guajacreaktion zum Blutnachweis vielfach empfohlen wird. Wir wählten eine wässerige Lösung von reinem salzsauren

Benzidin und ersetzten dieselbe im Parallelversuch durch dieselbe Menge Kochsalzlösung.

Tabelle VII.

Nr.	Zeit nach Einfallen des Schälchens	Entwick. Gas ccm	Differenz der Ablesung	H_2O_2	Blut	Badtemperatur	Ablesetemperatur	Barometerstand mm	Bemerkungen
25.	0′	0	0	25 ccm der	0,1 ccm der	39°	18,5°	749	
	1′	0,6	0,6	H_2O_2-Lsg.	üblichen				
	6′	0,8	0,2	und 5 ccm	Mischung				
	11′	1,2	0,4	salz-					
	16′	1,6	0,4	sauren					
	21′	2,0	0,4	Benzi-					
	26′	2,4	0,4	dins (5%)					
	31′	3,0	0,6						
26.	0′	0	0	25 ccm der	do.	39°	19°	749	
	1′	1,6	1,6	H_2O_2-Lsg.					
	6′	4,4	2,8	und 5 ccm					
	11′	6,4	2,0	einer 5%-					
	16′	7,6	1,2	Koch-					
	21′	8,4	0,8	salz-					
	26′	9,2	0,8	lösung					
	31′	9,8	0,6						

Der Einfluß des Benzidins, das im Überschuß zugesetzt war — nach beendigtem Versuch war noch unverändertes Benzidin vorhanden —, erstreckt sich deutlich nur auf einen Teil des abspaltbaren Sauerstoffs; die Entwicklung wird gehemmt, aber nicht aufgehoben. Diese Erscheinung spricht dafür, daß in dem durch Blut in toto entwickelten Sauerstoff dieses Element mit verschiedenen Oxydationspotentialen auftritt, so daß einer Auffassung, die neben der Hämase die Tätigkeit einer Oxydase auch schon bei der Zersetzung des reinen H_2O_2 annimmt, nichts im Wege steht. Die Verschiedenheit des Reaktionsverlaufs in Versuch 25 und 26 zeigen besonders deutlich die Kurven (Fig. 7).

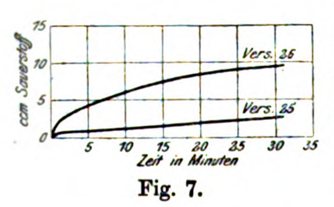


Fig. 7.

Alkohol wird unter dem Einfluß der Blutoxydase nicht durch H_2O_2 oxydiert, ebensowenig wie Traubenzucker und Fett, für welche Substanzen Lesser[1]) diese Tatsache festgestellt hat.

Tabelle VIII.

Nr.	Zeit nach Einfallen des Schälchens	Ent-wick-Gas ccm	Differenz der Ablesung	H_2O_2	Blut	Badtemperatur	Ablese-temperatur	Barometer-stand mm	Bemerkungen
38.	0′	0	0	25 ccm der	0,1 ccm der	39°	21°	761	
	1′	1,0	1,0	Lösung	üblichen				
	6′	1,6	0,6	und 5 ccm	Mischung				
	11′	2,6	1,0	H_2O.	(neues				
	16′	3,6	1,0		Tier;				
	21′	4,2	0,6		weißes				
	26′	5,0	0,8		Kaninch.)				
	31′	5,6	0,6						
36.	0′	0	0	25 ccm der	do.	39°	22°	761	
	1′	1,0	1,0	Lösung	(dasselbe				
	6′	1,4	0,4	und 5 ccm	Tier)				
	11′	2,4	1,0	Alkohol					
	16′	3,2	0,8	(96%)					
	21′	4,2	1,0						
	26′	5,2	1,0						
	31′	5,8	0,6						
37.	0′	0	0	25 ccm der	do.	39°	22°	761	
	1′	1,0	1,0	Lösung	(dasselbe				
	6′	1,6	0,4	und 2 ccm	Tier)				
	11′	2,6	1,0	Alkohol					
	16′	3,8	1,2	+ 3 ccm					
	21′	4,4	0,6	H_2O					
	26′	5,2	0,6						
	31′	6,0	0,8						

Die Wiedergabe der fast genau übereinstimmenden Kurven für die Wasser- bzw. Alkoholversuche dürfte sich erübrigen. Auch braucht nicht besonders hervorgehoben zu werden, daß bei dem festgestellten Einfluß der Tierindividualität für alle vergleichbaren Versuche Blutproben von dem gleichen Kaninchen entnommen wurden und zwar möglichst an einem Tage, um von irgendwelchen unkontrollierbaren Schwankungen der Blutbeschaffenheit unabhängig zu bleiben.

[1]) Zeitschr. f. Biol.. 48. 1, 1906.

Als weitere Depolarisatoren wurden mit positiven Resultaten benutzt Formaldehyd, Pyrogallussäure und Salicylaldehyd, die wir mit den zum Vergleich angestellten Versuchen

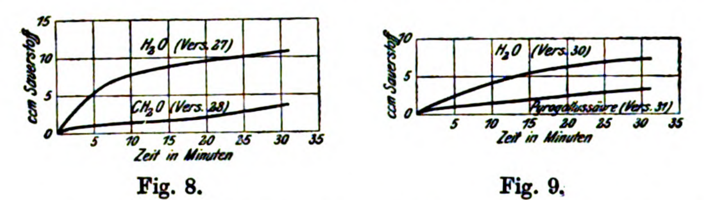


Fig. 8. Fig. 9.

unter Zusatz der gleichen Menge Wasser in der folgenden Tabelle und den auf diese Versuche bezüglichen Kurven zusammenstellen. (Fig. 8 u. 9.)

Tabelle IX.

Nr.	Zeit nach Einfallen des Schälchens	Ent. wick. Gas ccm	Differenz der Ablesung	H_2O_2	Blut	Badtemperatur	Ablese-temperatur	Barometer-stand mm	Bemerkungen
27.	0′	0	0	25 ccm der üblichen H_2O_2-Mischung und 5 ccm H_2O	0,1 ccm Blut-mischung.	39°	19°	749	
	1′	1,6	1,6						
	6′	6,0	4,4						
	11′	7,6	1,6						
	16′	8,6	1,0						
	21′	9,4	0,8						
	26′	10,2	0,8						
	31′	10,8	0,6						
28.	0′	0	0	25 ccm der Lösung und 5 ccm einer 4%-Formollösung	do.	39°	20°	749	
	1′	1,0	1,0						
	6′	1,2	0,2						
	11′	1,8	0,6						
	16′	2,2	0,4						
	21′	2,8	0,6						
	26′	3,2	0,4						
	31′	3,6	0,4						
29.	0′	0	0	do.	do. (neues Tier)	39°	18°	749	
	1′	1,0	1,0						
	6′	1,2	0,2						
	11′	1,6	0,4						
	16′	2,0	0,4						
	21′	2,4	0,4						
	26′	3,0	0,6						
	31′	3,6	0,6						

Tabelle IX (Fortsetzung).

	Zeit nach Einfallen des Schälchens	Entwick. Gas ccm	Differenz der Ablesung	H_2O_2	Blut	Badtemperatur	Ablesetemperatur	Barometerstand mm	Bemerkungen
30.	0′	0	0	25 ccm der H_2O_2-Lsg. und 5 ccm H_2O	do.	39°	19°	762	
	1′	1,0	1,0						
	6′	2,6	1,6						
	11′	4,2	1,6						
	16′	5,4	1,2						
	21′	6,2	0,8						
	26′	6,8	0,6						
	31′	7,4	0,6						
31.	0′	0	0	25 ccm der H_2O_2-Lsg. und 5 ccm einer 5%-Pyrogallus-Lösung	do.	39°	18°	762	
	1′	0,8	0,8						
	6′	1,0	0,2						
	11′	1,4	0,4						
	16′	2,0	0,6						
	21′	2,6	0,6						
	26′	3,0	0,4						
	31′	3,4	0,4						
32.	0′	0	0	25 ccm der Lösung und 1 ccm 5%-Pyrogallus-Lösung + 4 ccm H_2O	do.	39°	18°	762	
	1′	0,8	0,8						
	6′	1,0	0,2						
	11′	1,4	0,4						
	16′	2,0	0,6						
	21′	2,6	0,6						
	26′	3,2	0,6						
	31′	3,6	0,4						
33.	0′	0	0	25 ccm der Lösung und 5 ccm Salicylaldehyd	do. (dasselbe Tier)	39,5°	21,5°	763	
	1′	1,4	1,4						
	6′	1,5	0,1						
	11′	1,9	0,4						
	16′	2,3	0,4						
	21′	2,8	0,5						
	26′	3,1	0,3						
	31′	3,5	0,4						
	36′	3,9	0,4						

Die Kurve für Salicylaldehyd stimmt fast genau mit der für Pyrogallussäure überein.

Versuche mittels der Druckmethode.

Die schon erwähnte Notwendigkeit, unsere gemeinsame Arbeit vor ihrem endgültigen Abschluß abzubrechen, ist die Veranlassung für die geringe Zahl der mittels des manometrischen Apparats, bezüglich dessen Konstruktion wir auf die erste Mitteilung verweisen, angestellten Beobachtungen. Unsere ersten Versuche galten dem Vergleich der beiden Methoden. Es kam darauf an, zu entscheiden, ob die Ausschläge bei ihnen proportional blieben. Zu dem Zweck wurden zu gleicher Zeit gleiche Blutmengen von demselben Tier in beiden Apparaten, welche dieselbe Menge H_2O_2 in übereinstimmender Konzentration enthielten, untersucht und die Zeitumsatzkurven einmal aus den Volumwerten, dann aus den Druckwerten aufgenommen.

Wir geben in der folgenden Tabelle einige Daten an.

Tabelle 10.

Nr.	Zeit nach Einfallen des Schälchens	Entwickeltes Gas ccm	Differenz der Ablesung	H_2O_2	Blut	Badetemperatur	Ablesetemperatur	Barometerstand	Bemerkungen
				a) Volumenapparat:					
46	0′	0	0	20 ccm der Lösung	0,1 ccm der übl. Blutmischung	39°	21°	765	
	1′	0,4	0,4						
	6′	0,8	0,4						
	11′	1,2	0,4						
	16′	1,6	0,4						
	21′	2,2	0,6						
	26′	2,6	0,4						
	31′	2,8	0,2						
				b) Blutmanometer:					
		Druck in cm Hg		20 ccm der Lösung	0,1 ccm der übl. Blutmischung			765	Versuche hiermit bei Zimmertemperatur =22° angestellt
	0′	0	0						
	1′	1,0	1,0						
	6′	2,4	1,4						
	11′	4,0	1,6						
	16′	5,4	1,4						
	21′	6,4	1,0						

Tabelle X (Fortsetzung).

Nr.	Zeit nach Einfallen des Schälchens	Entwickeltes Gas ccm	Differenz der Ablesung	H_2O_2	Blut	Badetemperatur	Ablesetemperatur	Barometerstand	Bemerkungen
				a) Volumenapparat:					
45	0′	0	0	20 ccm der Lösung	0,1 ccm der übl. Blutmischung (dasselbe Tier)	39°	21°	765	
	1′	0,4	0,4						
	6′	1,0	0,6						
	11′	1,4	0,4						
	16′	1,6	0,2						
	21′	1,7	0,1						
	26′	1,8	0,1						
	31′	2,0	0,2						
	36′	2,2	0,2						
	41′	2,4	0,2						
	46′	2,6	0,2						
	51′	2,6	0						
	56′	2,6	0						
	61′	2,7	0,1						
				b) Blutmanometer:					
		Druck in cm Hg							
	0′	0	0	20 ccm der Lösung	0,1 ccm der übl. Blutmischung	—	—	771	Zimmertemperatur = 20°
	1′	0,8	0,8						
	6′	3,0	2,2						
	11′	4,4	1,4						
	16′	5,4	1,0						
	21′	6,6	1,2						
	26′	7,6	1,0						
	31′	8,4	0,8						NB. Diese Lösung nach Beendigung des Prozesses mit noch etwas Blut versetzt, entwickelt weiter Gas.
	36′	9,0	0,6						
	41′	9,4	0,4						
	46′	9,8	0,4						
	51′	10,2	0,4						
	56′	10,5	0,3						
	61′	10,6	0,1						

Aus den vier angeführten Versuchen geht hervor, daß die mit beiden Methoden erzielbaren Resultate parallel gehen und reproduzierbar sind.

Auch bezüglich des Zusammenhanges zwischen dem entwickelten Sauerstoffdruck und der Erythrocytenzahl bzw. dem Hämoglobingehalt wollen wir uns auf die Angabe einiger weniger Versuche beschränken, die wir wegen des noch zu

kleinen Beobachtungsmaterials nur als vorläufige bezeichnen und nicht zu irgend welchen Schlußfolgerungen benutzen möchten.

Um bezüglich der Erythrocytenzahl und des Hämoglobingehaltes mit sicheren Werten arbeiten zu können, wurde dasselbe Blut in wechselnder Konzentration angewandt, indem einmal im Melangeur das Blut nur bis zum Teilstrich 0,5, dann bis 1,0 aufgesogen und auf das gleiche Volum mit Wasser verdünnt wurde. Von beiden Mischungen gelangte dieselbe Menge 0,1 ccm in den Versuchen zur Verwendung.

Tabelle 11.

Nr.	Zeit nach Einfallen des Schälchens	Druck in cm Hg	Differenz der Ablesung	H_2O_2	Blut	Temp.
50	0′	0	0	20 ccm der übl. Lösung	bis Teilstrich 0,5 aufgesaugt, dann bis 101, (vergl. Vers. 10, Tab. 4) von der Mischung 0,1 ccm	22°
	1′	0,6	0,6			
	6′	1,6	1,0			
	11′	1,8	0,2			
	16′	2,6	1,8			
	21′	2,8	0,2			
	26′	3,0	0,2			
	31′	3,0	0			
	36′	3,0	0			
	41′	3,0	0			
51	0′	0	0	20 ccm der übl. Lösung	bis Teilstrich 1, wie sonst aufgesaugt, davon 0,1 ccm	23°
	1′	0,8	0,8			
	6′	1,4	0,6			
	11′	2,6	1,2			
	16′	3,4	0,8			
	21′	4,6	1,2			
	26′	5,4	0,8			
	31′	6,0	0,6			
	36′	6,8	0,8			
	41′	7,4	0,6			
	46′	7,8	0,4			
	51′	8,2	0,4			
	56′	8,4	0,2			
	61′	8,8	0,4			

Erythrocytenzahl = 3956000; Hämoglobin ca. 90 (nach Sahli-Gorer).

Der Einfluß der Verdünnung ist deutlich sichtbar; ebenso, daß bei Anwendung einer genügend geringen Blutmenge das scheinbare Gleichgewicht nach einer halben Stunde bereits er-

reicht ist. Eine Druckabnahme in einem einfachen Verhältnis zur Konzentration selbst läßt sich nicht konstatieren. Jedoch regen die mitgeteilten und andere gleichartige Versuche dazu an, den Wert der Einstellung des scheinbaren Gleichgewichtes in Abhängigkeit von Erythrocytenzahl und Hämoglobingehalt weiter zu verfolgen. Um so mehr scheint gerade diese Frage der eingehenden Untersuchung wert, als bereits Silbergleit und Mosse[1]), festgestellt haben, daß bei normalem Hämoglobin- und Blutkörperchengehalt und entsprechender Leukocytenzahl das Blut verschiedener gesunder Personen in fünf Minuten ziemlich gleich viel H_2O_2 (durch Titration mit Permanganat ermittelt) zersetzt und daß die Stärke der katalytischen Kraft des Blutes bei Gesunden durch die Blutkörperchenzahl maßgebend mitbestimmt ist. Die Arbeit wird zunächst zur weiteren Klarstellung der Depolarisatorenwirkung und der eben angedeuteten Zusammenhänge fortgeführt.

---

[1]) Beiträge z. klin. Med. Festschrift für H. Senator. 1904.

Berichtigung.

Seite 314 Zeile 16 von oben ließ: „in die um“ statt „in die in“.

Autorenverzeichnis.







